

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**Departamento de Química e Bioquímica**



## **Valorização das plantas medicinais em termos dos seus princípios activos**

**Diana Godinho Mendes**

**MESTRADO EM QUÍMICA**

**Especialização em Química, Saúde e Nutrição**

2011

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**Departamento de Química e Bioquímica**



**Valorização das plantas medicinais em termos dos seus  
princípios activos**

**Diana Godinho Mendes**

MESTRADO EM QUÍMICA

Especialização em QUÍMICA, SAÚDE E NUTRIÇÃO

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Amélia Pilar Grases Santos Silva Rauter

Dr. John Alwin McAdam

2011

*“Posso ter defeitos, viver ansioso e  
Ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço  
De que a minha vida é a maior empresa do mundo.  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver,  
Apesar de todos os desafios,  
Incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
Se tornar um autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz  
De encontrar um oásis no recôndito da sua alma.  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo  
Milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um “não”.  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta.  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia  
Vou construir um castelo...”*

*Fernando Pessoa*

# Agradecimentos

---

Começo por agradecer aos meus orientadores, Dr. John McAdam, da ERVITAL, e à Professora Doutora Amélia Pilar Rauter que, desde o início, apostou em mim e no meu trabalho, dando-me a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Química dos Glúcidos.

Agradeço também a orientação, na parte laboratorial, da Doutora Alice Martins, pela sua ajuda, calma e paciência, e principalmente, pelo carinho que sempre demonstrou.

Quero agradecer a colaboração dos Mestres Nuno Neng e Carlos Almeida, assim como do Professor Doutor José M. Nogueira, do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, por nos terem facultado a utilização do aparelho HPLC-DAD.

Ao Doutor Paulo Amorim Madeira, Doutor Mohammad Safi Shalamzari e Doutora Shabnam Behrouzi (Centro de Espectrometria de Massa da FCUL), pela sua colaboração na análise por Espectrometria de Massa de algumas das fracções obtidas por cromatografia em coluna.

Gostaria também de agradecer ao Professor Doutor Humberto Ferreira e aos seus colaboradores, Mestres Inês Fernandes e José Condeço, do Instituto Superior Técnico, pela forma calorosa como me receberam no Laboratório de Espectrometria de Massa e por toda a ajuda disponibilizada, imprescindível, na análise e caracterização de algumas amostras, contribuindo para a confirmação da estrutura de alguns dos compostos obtidos.

É importante referir também o apoio, ajuda e disponibilidade que os meus colegas de Laboratório sempre demonstraram. Obrigada Rita, Daniela, Catarina, Patrícia, João e Simão pelo ambiente descontraído, mas sempre profissional no nosso laboratório. Outros colegas fora do Grupo dos Glúcidos foram igualmente importantes durante a realização deste trabalho, não no laboratório, mas nos momentos de descontração. Obrigada Sofia Frade, Rita Gomes, Vanessa e Vasco, sempre pela boa gargalhada que

me proporcionaram. Um grande Obrigado à Tânia, por todas as conversas e momentos de descontração que passámos.

Um Obrigado especial à Sofia Rodrigues e Lara Ribeiro, colegas de Mestrado, que sempre me ajudaram e me apoiaram no início desta minha jornada por Lisboa.

Obrigada a todos os meus amigos de Espinho e antigos colegas da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto que, mesmo à distância, sempre me apoiaram, me deram força para me mudar de malas e bagagens para Lisboa e prosseguir o meu sonho.

Aos meus amigos de infância de Vila Real de Santo António que, apesar de longe, sempre estiveram no meu coração, em todos os momentos, bons e menos bons.

Por fim, mas nunca em último lugar, como não podia deixar de ser, quero agradecer aos meus pais que desde sempre me incentivaram, mesmo de longe, na realização deste Mestrado, e me apoiaram em todos os momentos, tantos nos bons como nos menos bons. Ao meu irmão, pelo simples facto de sempre me ter aturado, até nas piores alturas, durante todo o tempo de realização deste trabalho.

A Todos, MUITO OBRIGADA

# Resumo

---

Este trabalho teve como principal objectivo mais geral a valorização das plantas medicinais quanto aos seus princípios activos, particularizado ao estudo de *Genista tenera*. Trata-se de uma planta endémica da Ilha da Madeira, usada localmente na medicinal tradicional, sob a forma de infusão, para o tratamento da diabetes.

O estudo preliminar da composição química da infusão é aqui apresentado pela primeira vez e pretende contribuir para o estabelecimento da relação perfil fitoquímico/bioactividade desta planta.

Iniciou-se o presente trabalho com o fraccionamento do extracto aquoso, através de técnicas cromatográficas em coluna preparativa sob pressão moderada e HPLC. As fracções recolhidas foram analisadas por espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS). Nas fracções de composição mais simples foi feita uma tentativa de identificação dos flavonóides maioritários, com base nos respectivos espectros de massa, padrões de fragmentação e comparação com dados publicados na literatura.

Assim, recorrendo à técnica de ESI-MS/MS, no modo positivo, foram identificados os compostos crisoeriol e epicatequina. A mesma técnica, no modo negativo, permitiu identificar as isoflavonas biochanina A, genisteína e os 7-*O*-glucósido de genisteína, 7-*O*-glucósido de orobol e/ou orobol C-glucosilado na posição 8. As flavonas apigenina, bem como as flavonas C-glicosiladas vitexina/isovitexina, o 7-*O*-glucósido de luteolina e luteolina *O*- e C-glucosilada encontram-se presentes nas amostras analisadas.

A identificação inequívoca dos flavonóides acima discriminados necessita ser comprovada posteriormente, recorrendo a outras técnicas espectroscópicas como o ultravioleta (UV) e a ressonância magnética nuclear ( $^1\text{H}$ RMN e  $^{13}\text{C}$ RMN), após o seu isolamento por técnicas preparativas.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam no entanto a existência de flavonóides como constituintes maioritários presentes na infusão de *Genista tenera*. Atendendo às propriedades anti-hiperglicemiantes atribuídas a este grupo de compostos por diversos autores, o presente trabalho poderá constituir, de algum modo, um suporte científico à utilização etnofarmacológica desta planta.

# Lista de Símbolos, Unidades e Abreviaturas

---

**CCF** – Cromatografia em Camada Fina Analítica

**CCFP** – Cromatografia em Camada Fina Preparativa

**CC** – Cromatografia em Coluna

**ESI-MS** – *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray*)

**ESI-MS/MS** – *Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* acoplada à Espectrometria de Massa sequencial)

**HPLC** – *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

**HPLC-MS/MS** – *High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa sequencial)

**MS** – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massa)

***m/z*** – Razão massa/carga

**p.a.** – *pro analysis*

**NP-PEG** - Natural Products – Polyethylenglycol

**R<sub>f</sub>** – *Retention factor* (Factor(es) de retenção)

**UV** – Espectroscopia de ultravioleta: Luz Ultravioleta

# Índice Geral

---

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Lista de Símbolos, Unidades e Abreviaturas .....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Tabelas .....	ix
Índice de Figuras .....	x
Índice de Anexos.....	xi
1. Introdução .....	1
1.1. Introdução geral.....	1
1.2. Fundamentos Teóricos.....	3
1.2.1. Compostos fenólicos.....	3
1.2.1.1. Ácidos fenólicos .....	4
1.2.1.2. Flavonóides.....	5
1.2.1.2.1. Distribuição e localização dos flavonóides nas plantas .....	8
1.2.1.2.2. Funções biológicas dos flavonóides .....	8
1.3. Caracterização da planta em estudo .....	9
1.3.1. Caracterização botânica.....	9
1.3.2. Caracterização química .....	10
1.3.3. Caracterização farmacológica .....	14
1.4. Técnicas de análise usadas no isolamento e caracterização de compostos fenólicos.....	15
1.4.1. Métodos cromatográficos.....	16
1.4.1.1. Cromatografia em camada fina .....	16
1.4.1.2. Cromatografia em coluna.....	17
1.4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	17
1.4.2. Métodos espectroscópicos e espectrométricos.....	18
1.4.2.1. Espectroscopia de UV-Vísivel .....	18
1.4.2.2. Espectrometria de massa .....	19
2. Materiais e Métodos .....	20
2.1. Estudo fitoquímico da infusão de <i>Genista tenera</i> .....	20
2.1.1. Material vegetal .....	20



2.1.2. Preparação do extracto aquoso .....	20
2.1.3. Eluentes e reagentes .....	20
2.1.4. Análise e fraccionamento do extracto .....	21
2.1.4.1. Cromatografia em camada fina analítica .....	21
2.1.4.1.1. Características das placas .....	21
2.1.4.1.2. Aplicação da amostra e desenvolvimento das placas .....	21
2.1.4.1.3. Visualização das manchas .....	22
2.1.4.2. Cromatografia em coluna, sob pressão moderada .....	22
2.1.4.2.1. Características das colunas .....	23
2.1.4.2.2. Enchimento das colunas .....	23
2.1.4.2.3. Preparação das amostras .....	23
2.1.4.2.4. Eluição .....	24
2.1.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência .....	24
2.1.4.4. Cromatografia em camada fina preparativa .....	25
2.1.4.4.1. Características das placas preparativas .....	25
2.1.4.4.2. Aplicação da amostra e desenvolvimento das placas .....	25
2.1.4.4.3. Visualização das manchas .....	26
2.1.4.4.4. Recuperação e conservação dos produtos puros .....	26
2.1.5. Identificação estrutural dos compostos fenólicos .....	27
2.1.5.1. Espectroscopia de ultravioleta .....	27
2.1.5.2. Espectrometria de massa .....	27
3. Resultados e Discussão .....	29
3.1. Estudo fitoquímico da infusão de <i>Genista tenera</i> .....	29
3.1.1. Extracção e fraccionamento dos flavonóides .....	29
3.1.2. Identificação dos flavonóides .....	29
3.1.2.1. Espectrometria de massa .....	29
3.2. Caracterização dos flavonóides isolados .....	31
3.2.1. Identificação do crisoeriol .....	32
3.2.1.1. Espectro de massa .....	32
3.2.1.2. Estrutura do composto identificado .....	33
3.2.2. Identificação da Epicatequina .....	33
3.2.2.1. Espectro de massa .....	33
3.2.2.2. Estrutura do composto identificado .....	35
3.2.3. Identificação da Apigenina .....	35

3.2.3.1. Espectro de massa .....	35
3.2.3.2. Estruturas dos compostos identificados .....	36
3.2.4. Identificação da biochanina A .....	37
3.2.4.1. Espectro de massa .....	37
3.2.4.2. Estrutura do composto identificado .....	38
3.2.5. Identificação da vitexina .....	38
3.2.5.1. Espectro de massa .....	38
3.2.5.2. Estruturas dos compostos identificados .....	39
3.2.6. Identificação de 7- <i>O</i> -glucósido de genisteína .....	39
3.2.6.1. Espectro de massa .....	39
3.2.6.2. Estrutura do composto identificado .....	41
3.2.7. Identificação de 7- <i>O</i> -glucósido de orobol e/ou 8-glucosilorobol e/ou 7- <i>O</i> -glucósido de luteolina.....	41
3.2.7.1. Espectro de massa .....	41
3.2.7.2. Estruturas dos compostos identificados .....	43
3.2.8. Identificação da luteolina <i>O</i> -, <i>C</i> -glucosilada.....	43
3.2.8.1. Espectro de massa .....	43
4. Considerações Finais .....	45
5. Referências Bibliográficas .....	46
Anexos.....	I
Anexo A: Tabelas de registo de colunas cromatográficas .....	II
Anexo B: Espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS das amostras analisadas.....	IX

# Índice de Tabelas

---

<b>Tabela 1.1:</b> Classes de compostos fenólicos em plantas.....	4
<b>Tabela 1.2:</b> Flavonóides identificados em <i>Genista tenera</i> .....	12
<b>Tabela 1.3:</b> Alcalóides identificados em <i>Genista tenera</i> .....	14
<b>Tabela 1.4:</b> Actividades biológicas de extractos de <i>Genista tenera</i> .....	15
<b>Tabela 2.1:</b> Sistemas de eluição testados em CCF.....	22
<b>Tabela 3.1:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 291.....	34
<b>Tabela 3.2:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 269.....	36
<b>Tabela 3.3:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 283.....	37
<b>Tabela 3.4:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 431.....	38
<b>Tabela 3.5:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 431.....	40
<b>Tabela 3.6:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 447.....	42
<b>Tabela 3.7:</b> Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a m/z 609.....	44

# Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.1:</b> Estrutura parental de grande parte dos compostos designados flavonóides, que representa um flavano .....	5
<b>Figura 1.2:</b> Estruturas básicas dos diferentes tipos de flavonóides.....	7
<b>Figura 1.3:</b> Principais tipos de isoflavonóides.....	7
<b>Figura 1.4:</b> Piorno da Madeira ( <i>Genista tenera</i> ).....	9
<b>Figura 1.5:</b> Alguns flavonóides e isoflavonóides mais frequentes em espécies e subespécies do género <i>Genista</i> .....	11
<b>Figura 3.1:</b> Nomenclatura das fragmentações da aglícona.....	30
<b>Figura 3.2:</b> Nomenclatura da parte glicosídica.....	30
<b>Figura 3.3:</b> Nomenclatura das fragmentações em flavonóides <i>O</i> - e <i>C</i> -glicosilados .....	31
<b>Figura 3.4:</b> Mecanismo proposto para a formação dos iões do tipo $^{1,3}A^+$ .....	32
<b>Figura 3.5:</b> Mecanismo proposto para a formação dos iões do tipo $^{1,3}B^+$ .....	32
<b>Figura 3.6:</b> Estrutura do crisoeriol.....	33
<b>Figura 3.7:</b> Estrutura da epicatequina.....	35
<b>Figura 3.8:</b> Estruturas da apigenina e genisteína.....	36
<b>Figura 3.9:</b> Estrutura da biochanina A.....	38
<b>Figura 3.10:</b> Estruturas da vitexina e isovitexina.....	39
<b>Figura 3.11:</b> Mecanismo de fragmentação do ião $[M-H]^-$ de 7- <i>O</i> -glucósido de genisteína no modo negativo.....	40
<b>Figura 3.12:</b> Estrutura de 7- <i>O</i> -glucósido de genisteína.....	41
<b>Figura 3.13:</b> Estrutura das isoflavonas 7- <i>O</i> -glucósido de orobol e 8-glucosilorobol e da flavona 7- <i>O</i> -glucósido de luteolina.....	43

# Índice de Anexos

---

<b>Anexo A: Tabelas de registo de colunas cromatográficas.....</b>	<b>II</b>
<b>Tabela A.1:</b> Registo de coluna cromatográfica A.....	<b>II</b>
<b>Tabela A.2:</b> Registo de coluna cromatográfica B.....	<b>III</b>
<b>Tabela A.3:</b> Registo de coluna cromatográfica Di.....	<b>IV</b>
<b>Tabela A.4:</b> Registo de coluna cromatográfica Ei.....	<b>V</b>
<b>Tabela A.5:</b> Registo de coluna cromatográfica Fi.....	<b>VI</b>
<b>Tabela A.6:</b> Registo de coluna cromatográfica Gi.....	<b>VII</b>
<b>Tabela A.7:</b> Registo de coluna cromatográfica Hi.....	<b>VIII</b>
<b>Anexo B: Espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS das amostras analisadas.....</b>	<b>IX</b>
<b>Anexo B.1:</b> Espectro de massa da amostra Gi 1/2 no modo positivo (MS SCAN).....	<b>IX</b>
<b>Anexo B.2:</b> Espectro de massa da amostra Gi 1/2 no modo positivo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto epicatequina.....	<b>X</b>
<b>Anexo B.3:</b> Espectro de massa da amostra Gi 7/10 no modo positivo (MS SCAN).....	<b>XI</b>
<b>Anexo B.4:</b> Espectro de massa da amostra Gi 7/10 no modo positivo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto crisoeriol.....	<b>XII</b>
<b>Anexo B.5:</b> Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (MS SCAN).....	<b>XIII</b>
<b>Anexo B.6:</b> Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos vitexina e isovitexina.....	<b>XIV</b>
<b>Anexo B.7:</b> Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto luteolina <i>O</i> -, <i>C</i> -glucosilada.....	<b>XV</b>
<b>Anexo B.8:</b> Espectro de massa da amostra Ei-5 no modo negativo (MS SCAN).....	<b>XVI</b>
<b>Anexo B.9:</b> Espectro de massa da amostra Ei-5 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto biochanina A.....	<b>XVII</b>
<b>Anexo B.10:</b> Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (MS SCAN).....	<b>XVIII</b>
<b>Anexo B.11:</b> Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto 7- <i>O</i> -glucósido de genisteína.....	<b>XIX</b>

**Anexo B.12:** Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos 7-*O*-glucósido de orobol, 8-glucosilorobol e 7-*O*-glucósido de luteolina .....XX

**Anexo B.13:** Espectro de massa da amostra A<sub>10/13</sub> no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos apigenina e genisteína.....XXI

# 1. Introdução

---

## 1.1. Introdução geral

A Organização Mundial de Saúde entende como “planta medicinal” aquela que, nativa ou cultivada, é utilizada com fins medicinais. Já o mundo científico define “planta medicinal” como “uma planta que contém substâncias bioactivas, podendo ser venenosas ou tóxicas”. Em sentido muito genérico, consideram-se como plantas medicinais todas aquelas cujo uso pelas populações ao longo dos tempos foi reconhecido pelo seu efeito benéfico para a saúde (Proença da Cunha *et al.*, 2007b).

Ainda hoje, as plantas constituem a principal forma de resposta às necessidades de cuidados de saúde nos países menos desenvolvidos, chegando aos 80% da população mundial. Por outro lado, e por várias razões, tem-se igualmente vindo a observar um crescente interesse por parte de países desenvolvidos na Europa, América do Norte e Austrália, no recurso à fitoterapia, constituindo, em certos casos, uma grande ajuda nos cuidados primários de saúde.

A etnobotânica é a ciência que estuda as plantas e suas interações entre populações humanas, despoitando como um campo interdisciplinar que compreende o estudo e a interpretação do conhecimento, significado cultural, manuseamento e usos tradicionais dos elementos da flora.

A selecção etnofarmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento pode ser baseada em testemunhos populares, sendo esta uma ferramenta valiosa para a descoberta de novos fármacos. A etnofarmacologia, por se basear nos testemunhos populares da utilidade terapêutica das espécies, é particularmente útil no reconhecimento de doenças com fisiopatologia desconhecida e na identificação de produtos com novos mecanismos de acção.

As plantas, como todos os organismos vivos, possuem numerosos constituintes de natureza química bem definida. Alguns deles encontram-se normalmente presentes em todas as plantas, enquanto outros, sobretudo os de metabolismo secundário,

muitas vezes em pequenas quantidades, podem pela presença particular, caracterizar uma dada espécie ou género (Proença da Cunha *et al.*, 2007b).

Para além do ou dos constituintes activos, existem nas plantas medicinais outros compostos que podem influenciar a acção destes. Estes compostos, em muitos casos, protegem os constituintes activos de alterações, nomeadamente oxidações, hidrólises, isomerizações, etc., ao inibirem sistemas enzimáticos, ou podem até permitir uma melhor absorção de metabolitos pelo organismo, ao facilitarem a sua passagem pelas membranas.

Muitas das acções terapêuticas exibidas pelas plantas medicinais decorrem da sua actividade antioxidante. De entre os diferentes tipos de compostos naturais, o grupo dos compostos fenólicos, em que se incluem os flavonóides, é, talvez, o mais estudado, com actividade antioxidante comprovada em diversos sistemas.

Em todo o mundo, e cada vez mais, surgem linhas de investigação tentado encontrar um suporte científico para a actividade terapêutica de muitas espécies usadas na medicina popular tradicional. E é exactamente neste contexto que se insere o presente trabalho.

A *Genista tenera*, vulgarmente conhecida por piorno, é uma planta endémica da Ilha da Madeira que é utilizada pela população local no controlo da diabetes. O estudo da sua composição química, bem como as actividades biológicas de alguns dos seus extractos, têm sido levados a cabo pelo Grupo de Química dos Glúcidos do CQB-FCUL, encontrando-se os resultados obtidos até à presente data publicados na literatura.

A presente dissertação pretende dar continuidade ao trabalho já iniciado, apresentando pela primeira vez os resultados obtidos na caracterização química do extracto aquoso da planta, recorrendo a técnicas cromatográficas analíticas e preparativas bem como à espectrometria de massa.

Os compostos fenólicos em geral, e os flavonóides em particular, são muito característicos do género *Genista*. A presença destes compostos no extracto aquoso de *Genista tenera* foi detectada por cromatografia em camada fina analítica, utilizando como revelador o reagente NP-PEG (Martins, 2006). Assim, julgou-se pertinente fazer uma breve abordagem teórica a este grupo de compostos.



## 1.2. Fundamentos Teóricos

### 1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem uma das classes de produtos de metabolismo secundário das plantas (Tapas *et al.*, 2008), sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Formam-se em condições de stress, como infecções, ferimentos, radiações UV, entre outros, estando presentes em todos os tecidos vegetais. As substâncias de natureza fenólica mais abundantes nas plantas pertencem às classes dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos. Outras classes têm uma distribuição mais discreta, tais como os isoflavonóides, antraquinonas e xantonas.

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, pelo menos, um anel benzénico, que está ligado directamente a, pelo menos, um grupo hidróxilo livre ou envolvido numa outra função: éter, éster, heterósido (Proença da Cunha *et al.*, 2005). Os monossacáridos associados a estes compostos incluem a glucose, galactose, arabinose, entre outros açúcares, sendo também possível a sua presença sob formas mais complexas (di-, tri- ou tetrassacáridos). Para além destas formas hidrossolúveis, os compostos fenólicos existem também sob formas poliméricas menos polares. Possuem estrutura variável e, com isso, são multifuncionais. É, no entanto, uma definição que possui inúmeras excepções.

Hoje, aceita-se como uma boa definição de compostos fenólicos todos aqueles que não sendo azotados tem um ciclo ou ciclos aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo da ácido xiquímico (Proença da Cunha *et al.*, 2005). Existem cerca de cinco mil fenóis, dentro deles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis.

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (Proença da Cunha *et al.*, 2005).

**Tabela 1.1:** Classes de compostos fenólicos em plantas (Balasundram *et al.*, 2006)

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzóicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Nafitoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Estilbenos, antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
<b>Flavonóides, isoflavonóides</b>	<b>C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub></b>
Lignanas, neolignanas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Bioflavonóides	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Lignanas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

#### 1.2.1.1. Ácidos fenólicos

A denominação geral de ácidos fenólicos pode ser aplicada a todos os compostos orgânicos que possuem, pelo menos, um anel benzênico, uma função carboxílica e um hidroxilo e/ou metoxilo na molécula (Bruneton, 1999), conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais. Esta denominação compreende os ácidos benzóicos, com sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), que são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza e os ácidos cinâmicos, com nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), sendo sete os mais vulgarmente encontrados no reino vegetal.

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também ligar-se entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido cafeico o qual, associado a um álcool/ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogénico.

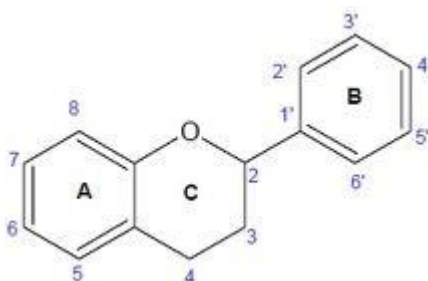
Os fenóis simples são bastante raros nas plantas, com excepção dos derivados da hidroquinona que existem em diversas famílias, geralmente sob a forma de glucósido de um difenol ou do seu monometiléter. São relativamente abundantes no reino vegetal os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, em especial os compostos hidroxilados, alguns deles ligados a oses (Proença da Cunha *et al.*, 2005).

### 1.2.1.2. Flavonóides

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e têm inúmeras funções na natureza, formando um grupo vasto de metabolitos secundários com actividades biológicas muito diversas (Campos, 2005). Até ao ano de 2008, foram identificadas mais de 8000 variedades de flavonóides (Tapas *et al.*, 2008). A estas substâncias se deve a maior parte das cores vermelha, azul e violeta das plantas, para além da coloração branca e amarela (Campos *et al.*, 2005).

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular que estão presentes em toda a parte aérea das plantas, e podem ocorrer na forma de genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados. Os flavonóides na forma de genina (Figura 1.1) consistem num anel benzénico, normalmente denominado anel A, condensado com um anel de 6 membros, anel C, que, por sua vez, tem ligado um grupo fenilo ou fenilo substituído, B. O anel de seis membros C condensado com o anel benzénico, ou é uma  $\gamma$ -pirona – flavonóis e flavonas – ou o seu derivado (Tapas *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2005). A posição dos substituintes benzénicos divide a classe destas moléculas em:

- flavonóides, em que a substituição é na posição 2;
- isoflavonóides, em que a substituição é na posição 3;
- neoflavonóides, em que a substituição é na posição 4.



**Figura 1.1:** Estrutura parental de grande parte dos compostos designados flavonóides, que representa um flavano

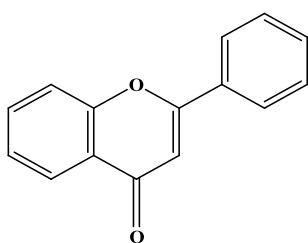
Os flavonóides são compostos com origem biossintética mista, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C sintetizados “via xiquimato”. Como consequência, o esquema de substituição mais frequente é a hidroxilação alternada no

anel A, nas posições 5 e 7, e a hidroxilação *para* no anel B, que pode ser do tipo 4'-OH, 3',4'-diOH ou 3',4',5'-triOH.

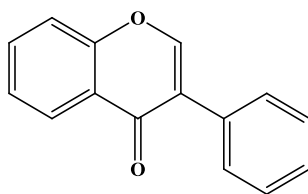
A variedade de estruturas (Figura 1.2) encontrada nas diferentes classes resulta de modificações posteriores, sendo a glicosilação e a metilação dos hidroxilos as mais comuns. Outras modificações, como metilação, metoxilação, hidroxilação adicional ou formação de C-glicosilflavonóides, entre outros, surgem na natureza com menos frequência (Campos, 2005).

Cerca de 80% dos flavonóides descritos em extractos vegetais incluem as flavonas (apigenina e luteolina), os flavonóis (o campferol e a quercetina) e as flavanonas (naringenina), encontrando-se frequentemente sob uma forma O-glicosilada. De entre estes compostos, os flavonóis são aqueles que possuem uma distribuição mais ampla, sendo a quercetina (3,3',4',5,7-penta-hidroxiflavona) o composto fenólico que ocorre com maior frequência na natureza. As antocianinas, outra forma estrutural de flavonóides, podem ocorrer em outros órgãos das plantas, tais como as raízes e folhas (Campos, 2005).

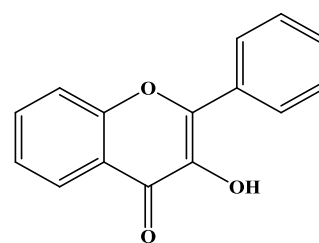
Os flavonóides apresentam duas bandas típicas de absorção no UV, a banda II, entre os 240 e os 285 nm (devida à absorção do anel A), e a banda I, entre 300 e 550 nm (devida ao anel B). A localização das bandas no espectro depende da estrutura base do flavonóide e do número e posição dos substituintes (Campos, 2005).



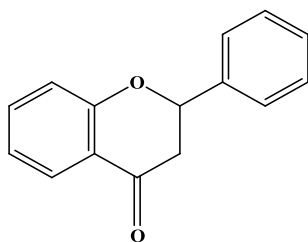
**Flavona**



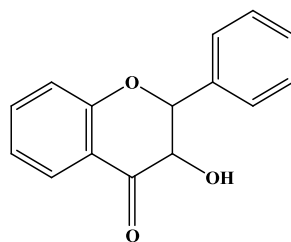
**Isoflavona**



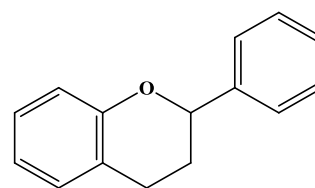
**Flavonol**



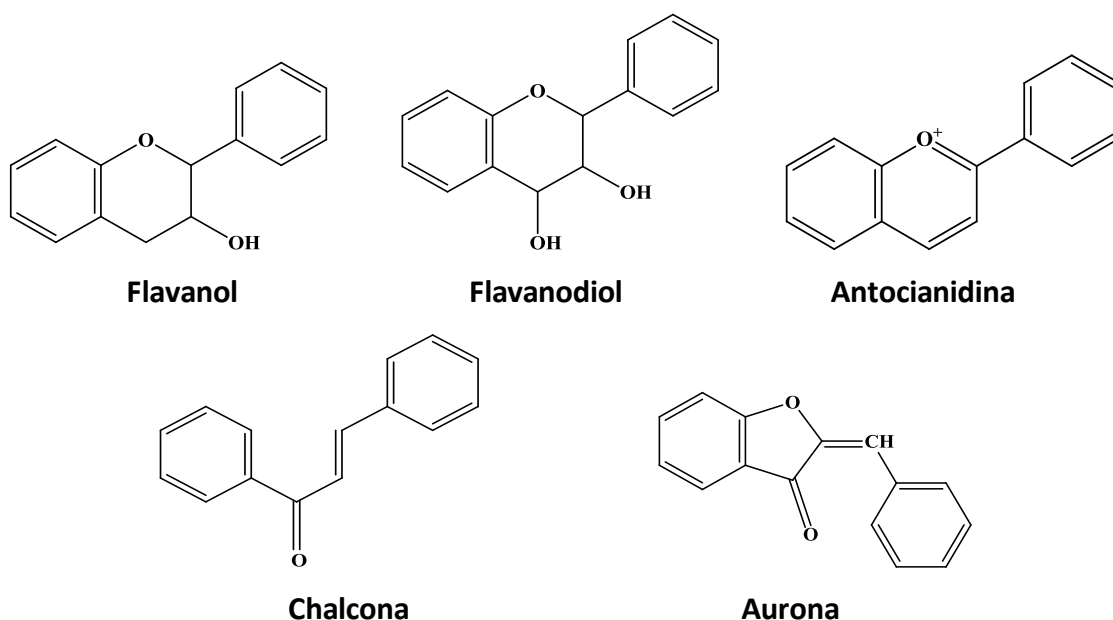
**Flavanona**



**Flavanonol**

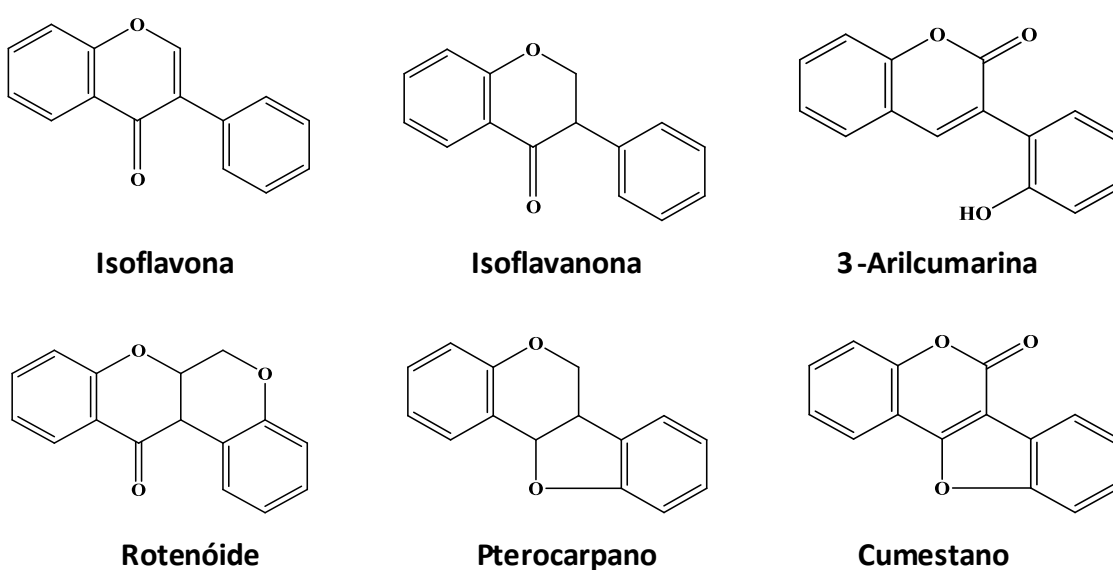


**Flavano**



**Figura 1.2:** Estruturas básicas dos diferentes tipos de flavonóides

Alguns autores consideram os isoflavonóides (Figura 1.3) como um grupo à parte. Isoflavonóides são uma classe de flavonóides, derivados da sua via biossintética através da naringenina. Os isoflavonóides, ao contrário dos flavonóides, têm na natureza uma distribuição muito restrita, aparecendo praticamente apenas na família *Fabaceae*.



**Figura 1.3:** Principais tipos de isoflavonóides

#### 1.2.1.2.1. Distribuição e localização dos flavonóides nas plantas

Os flavonóides encontram-se sobretudo nas plantas superiores. Estão bem representados nas Gimnospérmicas, mas é em algumas famílias das Angiospérmicas (Poligonáceas, Rutáceas, Leguminosas, Umbelíferas e Compostas) que a sua variedade estrutural é maior (Bruneton, 1999; Markham, 1989). Já a distribuição dos isoflavonóides é mais restrita, existindo nas Dicotiledóneas, mas sendo quase específicos das Fabáceas (Bruneton, 1999; Williams e Harborne, 1989). Todavia, a diminuta distribuição botânica transforma-os em importantes marcadores quimiotaxonómicos (Van Rensen *et al.*, 1999).

Até muito recentemente, os flavonóides eram referidos por se encontrarem em toda a parte aérea das plantas, dissolvidos nos vacúolos e por se localizarem geralmente nas células epidérmicas das folhas, flores e frutos. Mas nos últimos anos, descobriu-se que também podem estar ligados à parede celular, pelos menos, nos tecidos das Gimnospérmicas (Campos, 2005).

#### 1.2.1.2.2. Funções biológicas dos flavonóides

De um modo geral, estes compostos são produtos de defesa naturais das plantas que os produzem. O princípio de defesa natural é também válido para os isoflavonóides, pelas suas propriedades insecticidas, anti-bacterianas e anti-fúngicas.

Dependendo das suas estruturas químicas, os vários flavonóides têm diferentes actividades farmacológicas. Para além da sua reconhecida capacidade antioxidante, aos flavonóides são ainda atribuídas propriedades anti-inflamatórias, anti-alérgicas, hepatoprotectoras, anti-trombóticas, anti-virais e anti-cancerígenas (Tapas *et al.*, 2008).

Outra característica terapêutica destes compostos é a sua actividade estrogénica, a qual é sobretudo atribuída às isoflavonas e cumestanos, devido à sua semelhança estrutural com as hormonas estrogénicas (Garritano *et al.*, 2005; Heinrich *et al.*, 2004; Ying *et al.*, 2001). Encontram-se, aliás, comercializados vários fármacos à base de

isoflavonas de soja, como alternativa à terapêutica de substituição hormonal em mulheres pré e pós-menopáusicas. Medicamentos contendo flavonóides destinados ao tratamento de problemas circulatórios e hipertensão encontram-se igualmente disponíveis (Bruneton, 1999; Markham, 1989). Estes compostos são ainda considerados como agentes vasorelaxantes, e possuem efeitos anti-diabéticos, anti-ateroscleróticos e cardioprotectores (Tapas *et al.*, 2008).

## 1.3. Caracterização da planta em estudo

### 1.3.1. Caracterização botânica

*Genista* é um género botânico constituído por 87 espécies de arbustos da subfamília *Papilionoideae*, predominantemente distribuídos na zona do Mediterrâneo (Percy and Cronk, 2002; Giachi *et al.*, 2002). Toleram solos pobres e necessitam de poucos cuidados no seu cultivo. Utilizam-se na recuperação de terrenos baldios, fixação de dunas ou como plantas ornamentais.

A espécie *Genista tenera* (Jacq. Ex Murr) O. Kuntze, vulgarmente conhecida como piorno da Madeira (Figura 1.4) pertence à família *Fabaceae* (*Leguminosae*), subfamília *Papilionoideae*, tribo *Genisteae*, género *Genista* e é um endemismo madeirense comum.



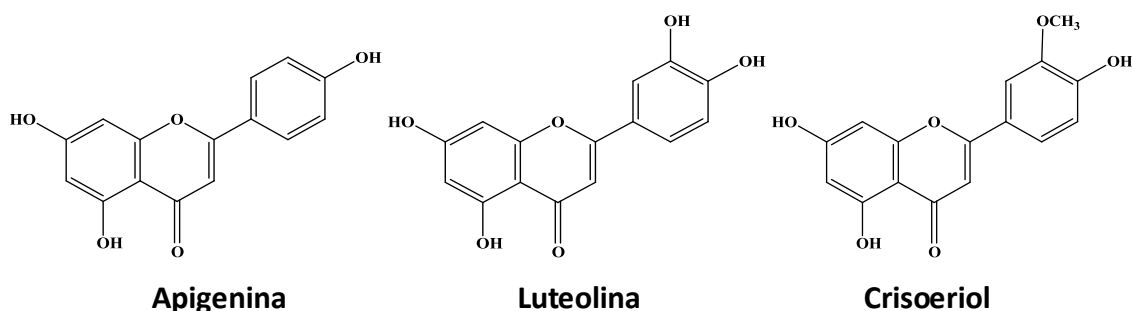
**Figura 1.4:** Piorno da Madeira (*Genista tenera*)

Apresenta-se como um arbusto perene com cerca de 2,5 metros de altura, com indumento acetinado, pubescente a prateado. Possui folhas sésseis, simples, linear-

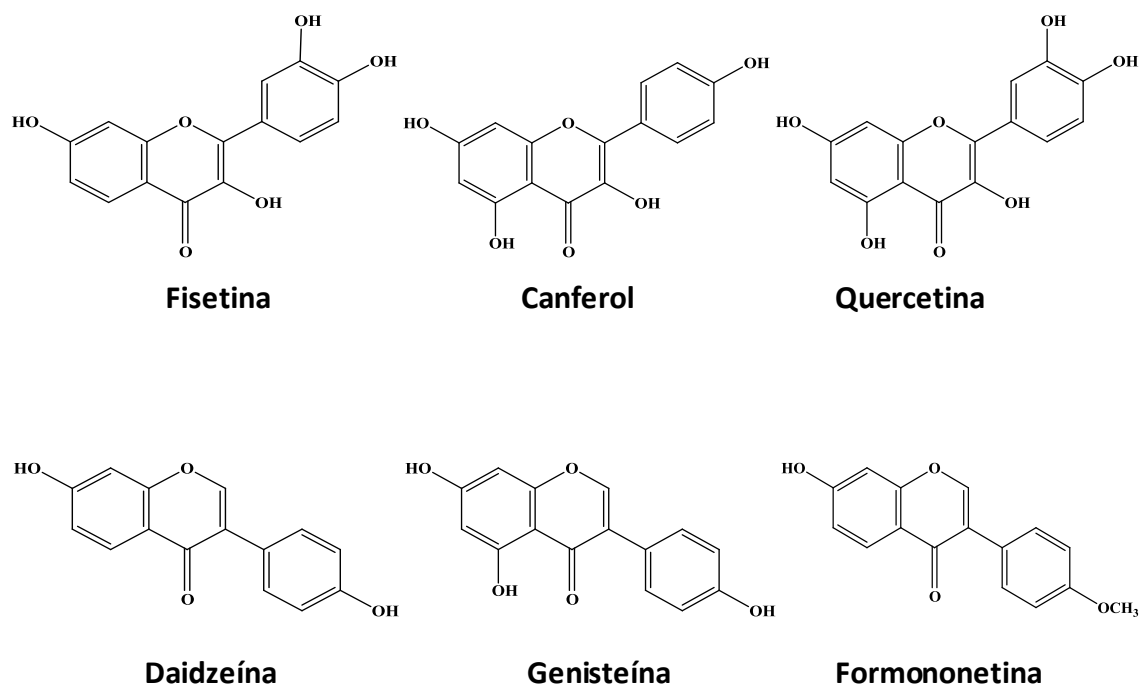
lanceoladas a obovadas, com 2,5 a 14 milímetros. As flores desta planta apresentam corola amarela, de 1 a 1,5 centímetros, dispostas em inflorescências racemosas terminais. Trata-se de uma espécie comum nas escarpas rochosas e expostas e em ravinas, em comunidades de substituição desde o nível do mar até cerca de 1700 metros de altitude. A floração desta espécie ocorre entre Março e Julho (Jardim e Francisco, 2000).

### 1.3.2. Caracterização química

À semelhança de outros géneros da subfamília *Papilionoideae*, o género *Genista* é caracterizado por conter flavonóides e isoflavonóides, bem como alcalóides de núcleo quinolizidina. Uma listagem exaustiva destes compostos em plantas da família *Leguminosae* foi descrita por Harborne (1994) e Polhill (1994) e uma revisão bibliográfica mais recente sobre os compostos identificados no género *Genista* foi efectuada por Vítor *et al.*, (2003) e Martins (2006). Também em 2006, Boumaza *et al.* identificaram seis flavonóides tais como: genisteína, 4'-glucósido de genisteína, 4',7-dihidroxi-5-metoxiisoflavona, 4',5,7-trihidroxi-3',8-dimetoxi-3-O-glucosilflavona, 3-glucósido de isorhamnetina e 3-glucósido de quercetina em *G. tricuspidata*. Por sua vez, Serrilli *et al.* (2010) identificaram a luteolina, genisteína, 6-hidroxigenisteína e pinitol em *G. cadasonensis*, enquanto que na *G. tinctoria* foram detectadas as isoflavonas daidzeína, genisteína, formononetina e respectivos glucósidos, daidzina, genistina e ononina (Hanganu *et al.*, 2010). Na figura 1.5 encontram-se as estruturas de flavonóides frequentemente encontrados no género *Genista*.







**Figura 1.5:** Alguns flavonóides e isoflavonóides mais frequentes em espécies e subespécies do género *Genista*

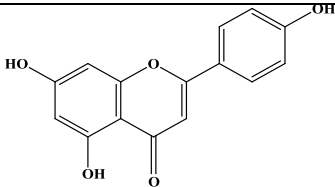
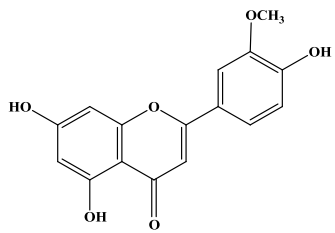
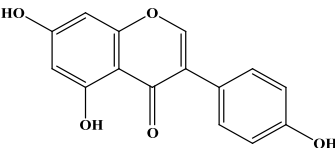
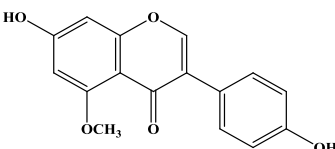
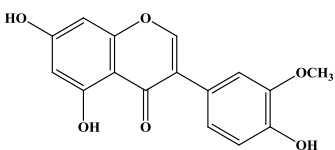
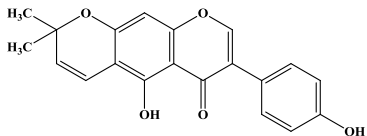
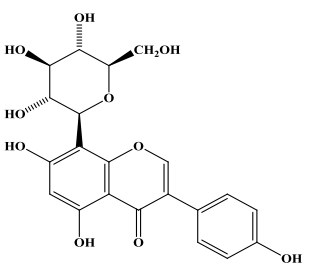
Relativamente ao conteúdo de alcalóides, Erdemoglu *et al.* (2009) identificaram dez alcalóides na espécie, *G. vurali*, nomeadamente: *N*-metilcitisina, citisina, tetrahidrorombifolina, 17-oxoesparteína, 5,6-dehidrolupanina, lupanina, 17-oxolupanina, anagrina, baptifolina e ainda 13- $\alpha$ -tigloyloxylupanina.

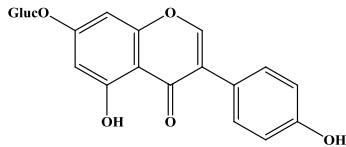
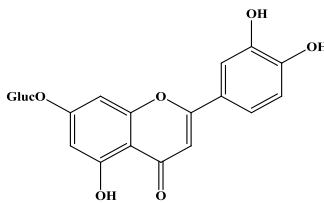
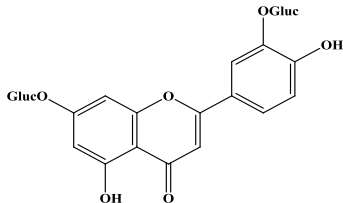
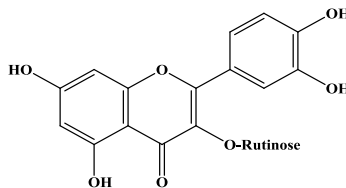
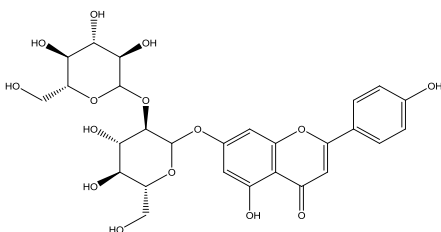
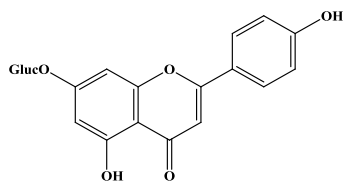
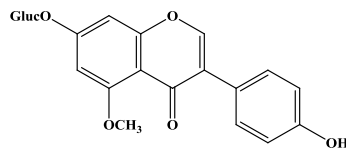
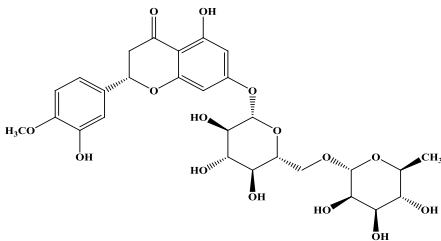
No caso particular da *G. tenera* foi já estudada a composição química de três extractos obtidos a partir da parte aérea seca (Rauter *et al.*, 2009; Martins, 2006; Edwards *et al.*, 2006; Rauter *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2001) A partir do extracto de éter dietílico foram isoladas as flavonas apigenina e crisoeriol, bem como as isoflavonas genisteína, 5-*O*-metilgenisteína, 3'-*O*- metilrobol e alpinumisoflavona. No extracto de acetato de etilo foram identificados os glicósidos de flavonóides 8-*C*-glucósido de genisteína, 7-*O*-glucósido de genisteína como constituintes maioritários, enquanto que as flavonas glicosiladas 7-*O*-glucósido de luteolina, 7,3'-di-*O*-glucósido de luteolina e rutina foram detectadas como compostos minoritários. Foi realizada ainda uma análise por HPLC-DAD-ESI-MS/MS ao extracto de *n*-butanol, tendo sido identificados os glicósidos de flavonas 7-*O*-(2'-*O*-glucosilglucósido) de apigenina, 7-*O*-glucósido de luteolina, 7,3'-di-*O*-glucósido de luteolina, 7-*O*-glucósido de apigenina, os

glicósidos de isoflavonas 8-glucosilgenisteína, 7-O-glucósido de genisteína, 7-O-glucósido de 5-O-metilgenisteína e o glicósido de flavanona hesperidina.

As estruturas de todos estes flavonóides encontram-se discriminadas na tabela 1.2.

**Tabela 1.2:** Flavonóides identificados em *Genista tenera*

	Composto	Estrutura	M.Molecular (u)
Flavona	Apigenina		270
Flavona	Crisoeriol		300
Isoflavona	Genisteína		270
Isoflavona	5-O-metilgenisteína		284
Isoflavona	3'-O-metilorobol		300
Isoflavona	Alpinumisoflavona		336
Isoflavona	8-glucosilgenisteína		432

<b>Isoflavona</b>	7- <i>O</i> -glucósido de genisteína		432
<b>Flavona</b>	7- <i>O</i> -glucósido de luteolina		448
<b>Flavona</b>	3',7-di- <i>O</i> -glucósido de luteolina		610
<b>Flavona</b>	Rutina		610
<b>Flavona</b>	7- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> -glucosilglucósido) de apigenina		594
<b>Flavona</b>	7- <i>O</i> -glucósido de apigenina		432
<b>Isoflavona</b>	7- <i>O</i> -glucósido de 5- <i>O</i> -metilgenisteína		446
<b>Flavanona</b>	Hesperidina		610

Nesta planta foram ainda identificados por GC e GC-MS (Tabela 1.3) os alcalóides citisina, *N*-metilcitisina, anagirina, lupanina, *N*-formilcitisina, desidrocitisina, rombifolina, afilina, termopsina e 5,6-desidrolupanina, encontrando-se os cinco primeiros numa posição maioritária (Martins *et al.*, 2005).

**Tabela 1.3:** Alcalóides identificados em *Genista tenera*

<b>Alcalóide</b>	<b><i>m/z</i></b>
<i>N</i> -Metilcitisina	204
Desidrocitisina	188
Citisina	190
5,6-Desidrolupanina	246
Rombifolina	244
Lupanina	248
Afilina	248
Termopsina	244
<i>N</i> -Formilcitisina	218
Anagirina	244

### 1.3.3. Caracterização farmacológica

Ensaio farmacológicos *in vitro* e *in vivo* efectuados com extractos de *G.tenera* permitiram avaliar as suas actividades antioxidante, anticolinesterásica e anti-diabética, bem como a sua toxicidade em linfócitos humanos (Rauter *et al.*, 2009).

A administração (i.p) de 200 mg/kg/dia do extracto de *n*-butanol, durante 15 dias consecutivos, provocou uma diminuição significativa (cerca de 50%) nos níveis de glucose de ratos Wistar com diabetes induzida pela estreptozotocina. Atendendo a que este extracto é maioritariamente constituído por flavonóides, pensa-se que estes compostos poderão ser os responsáveis pela diminuição da glicémia, já que os flavonóides se encontram referenciados como compostos de elevado potencial no controlo da diabetes (Tapas *et al.*, 2008). De facto, as propriedades antioxidantes destes compostos poderão, de algum modo, contribuir para a protecção das células  $\beta$

do pâncreas contra os efeitos nefastos da estreptozotocina. A capacidade antioxidante dos diferentes extractos de flavonóides, determinada pelo método do DDPH, bem como a actividade inibidora sobre o enzima acetilcolinesterase, envolvido na doença de Alzheimer, encontram-se resumidas na tabela 1.4. Nenhum dos extractos revelou possuir toxicidade no ensaio *in vitro* efectuado com linfócitos humanos (Rauter *et al.*, 2009).

**Tabela 1.4:** Actividades biológicas de extractos de *Genista tenera* (Rauter *et al.*, 2009)

Extractos	Actividade antioxidante (DDPH, % de inibição)	Actividade anticolinesterásica (% de inibição)
<b>Éter dietílico</b>	39.1	0
<b>Acetato de etilo</b>	48.7	77.0
<b><i>n</i>-Butanol</b>	24.0	23.5

Os resultados obtidos até ao momento com os extractos desta planta, encorajaram-nos a dar continuidade ao seu estudo. Uma vez que a sua aplicação etnofarmacológica é efectuada através da toma da infusão da parte aérea seca, seria de todo o interesse proceder à sua caracterização química. O extracto aquoso foi preparado segundo a metodologia utilizada pela medicina popular, recorrendo-se a métodos cromatográficos e espectroscópicos para a sua caracterização. Segue-se uma breve abordagem teórica às técnicas utilizadas.

## 1.4. Técnicas de análise usadas no isolamento e caracterização de compostos fenólicos

A identidade de compostos existentes nas plantas deve ser esclarecida pelo maior número de critérios possível, que incluem dados obtidos em processos cromatográficos e determinações espectrofotométricas e espectrométricas.

Atendendo ao trabalho já realizado nestes domínios e à disponibilidade no mercado de muitas substâncias de referência, a separação e posterior identificação de

compostos pode ser estabelecida por comparação de resultados obtidos com substâncias de referência anteriormente caracterizadas.

### 1.4.1. Métodos cromatográficos

As técnicas cromatográficas podem ser utilizadas com fins analíticos ou preparativos e têm como finalidade o isolamento e/ou identificação de compostos orgânicos muito diversos, incluindo os compostos fenólicos.

#### 1.4.1.1. *Cromatografia em camada fina*

A cromatografia em camada fina (CCF) pode ser usada a nível analítico ou a nível preparativo.

Esta técnica baseia-se na distribuição dos componentes de uma mistura ou solução entre duas fases, a móvel e a estacionária. Várias fases estacionárias podem ser usadas, como a alumina ou a sílica-gel, embora a mais frequentemente utilizada seja a sílica-gel; o eluente corresponde à fase móvel, sendo a sua escolha feita com base na polaridade dos compostos que se pretendem separar. Nesta técnica é colocado um pequeno volume de amostra na base de uma placa cromatográfica que é, de seguida, eluída numa câmara cromatográfica. O eluente sobe por capilaridade, arrastando os compostos presentes na mistura consoante as suas afinidades relativas para as fases móvel e estacionária.

A mobilidade de um composto num determinado eluente é traduzida pelo seu  $R_f$ . O interesse da CCF na identificação de compostos fenólicos reside na possibilidade de relacionar o valor de  $R_f$  de uma substância num determinado eluente com a estrutura em causa. Teoricamente, esse valor deveria ser uma característica reprodutível da substância.

É também possível deduzir alguns dados estruturais a partir da observação dos cromatogramas à luz visível e UV (254 e 366 nm), antes e depois de submeter os cromatogramas a certos reagentes químicos (reveladores).

#### *1.4.1.2. Cromatografia em coluna*

A cromatografia em coluna (CC) é uma técnica amplamente utilizada na separação de compostos fenólicos. O diâmetro interno da coluna é variável e o enchimento da coluna é, geralmente, sílica, com diâmetros de partícula também eles variáveis. Nalguns casos utilizam-se colunas de sílica de fase reversa ( $C_8$  ou  $C_{18}$ ). A eluição é desenvolvida a baixa pressão, recorrendo a uma grande variedade de sistemas de solventes. Tal como na CCF, a detecção pode ser feita por observação à luz visível ou UV.

#### *1.4.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência*

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é, na sua essência, uma forma de cromatografia líquida em coluna com grande poder de resolução, que se desenvolve a pressão elevada. Atendendo ao elevado nível de resolução e sensibilidade e à possibilidade de se efectuarem determinações quantitativas, esta técnica tem sido utilizada em investigação taxonómica e definição de perfis químicos de extractos vegetais (Markham, 1989). Adicionalmente, pode ser utilizada com fins preparativos.

Normalmente recorre-se a fases estacionárias constituídas por partículas de pequeno diâmetro (5  $\mu\text{m}$ ), revestidas de cadeias hidrocarbonadas com 8 ou 18 átomos de carbono (fase reversa), pois são aquelas com as quais se obtém melhor resolução. O tamanho da partícula e o comprimento da coluna vão condicionar a pressão desenvolvida. A sequência de eluição é determinada pela adsorção na fase estacionária e pode ser desenvolvida em gradiente ou em modo isocrático, sendo a fase móvel constituída por misturas de água e solventes orgânicos. Geralmente, são incluídas nas fases móveis pequenas concentrações de ácidos, que impedem a ionização de grupos ácidos presentes na amostra e melhoram a simetria dos picos, sendo os ácidos mais utilizados o acético e o fórmico. O fluxo usado para a eluição depende do tamanho da partícula e do comprimento da coluna, podendo variar entre 1 e 2 mL/min.

Uma vez que todos os compostos fenólicos absorvem na zona do UV, o detector universal para este tipo de compostos é o detector de DAD. Este tipo de detecção não

é destrutivo, o que representa uma vantagem quando se pretende utilizar subsequentemente um outro sistema de detecção para adquirir mais informação, ou quando se pretende proceder ao isolamento de compostos.

A disponibilidade de detectores de matriz de díodos aumenta a possibilidade de identificação dos compostos e permite o registo dos cromatogramas em diferentes comprimentos de onda. Este detector faculta o espectro de UV de cada composto eluído que, juntamente com o tempo de retenção, constituem dois parâmetros importantes para o processo de identificação dos compostos (Van Sumere, 1989; Waterman e Mole, 1994).

Actualmente, é frequente encontrar detectores de UV e de espectrometria de massa ou de ressonância magnética nuclear acoplados ao mesmo sistema de HPLC, permitindo a detecção, quantificação e identificação dos compostos numa única análise.

Por ser um método analítico sensível, exacto e rápido, a técnica de HPLC constitui o processo de eleição para a análise qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos.

## **1.4.2. Métodos espectroscópicos e espectrométricos**

### *1.4.2.1. Espectroscopia de UV-Vísivel*

Devido à presença de núcleos aromáticos, muitas vezes conjugados, os compostos fenólicos apresentam um espectro de UV característico, que pode fornecer elementos muito importantes para a sua caracterização estrutural.

Todos os compostos fenólicos exibem um ou mais máximos de absorção entre 230 e 290 nm (Harborne, 1989) e os espectros são habitualmente obtidos a partir de soluções metanólicas do composto puro (Markham, 1982; Waterman e Mole, 1994c).

Os flavonóides apresentam duas bandas de absorção no UV, a banda II, entre 240 e 285 nm, e a banda I, entre 300 e 550 nm, dependendo a localização das bandas no espectro da estrutura base do flavonóide e do número e posição dos substituintes (Markham, 1982).



#### 1.4.2.2. *Espectrometria de massa*

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica poderosa utilizada para:

- Identificar compostos desconhecidos.
- Quantificar materiais conhecidos.
- Elucidar as propriedades químicas e estruturas das moléculas.

Um espectrómetro de massa é um instrumento constituído por três componentes principais, a fonte de iões, que corresponde à zona do aparelho onde se formam os iões, o analisador, que permite a separação dos iões de acordo com as suas razões massa/carga ( $m/z$ ), e o detector de iões.

A classificação dos espectrómetros de massa é feita de acordo com o tipo e a ordem dos analisadores de iões que constituem o aparelho. Assim, existem instrumentos de sector, quadrupolo, “ion trap” e tempo de voo.

A principal aplicação da espectrometria de massa é a determinação da massa molecular de um composto. A massa exacta do ião molecular permite calcular a composição elementar de um dado composto. Da análise dos sinais resultantes da fragmentação do composto obtêm-se importantes informações para o esclarecimento da sua estrutura. Apesar de haver destruição da amostra, a grande vantagem deste método reside na reduzida quantidade de amostra necessária para análise.

## 2. Materiais e Métodos

---

### 2.1. Estudo fitoquímico da infusão de *Genista tenera*

#### 2.1.1. Material vegetal

A planta *Genista tenera* foi colhida na Ilha da Madeira, no início do período de floração, encontrando-se em exemplar “voucher” no Herbário do Jardim Botânico da Madeira, registado com a referência MADJ 2508.

#### 2.1.2. Preparação do extracto aquoso

Foi preparada uma infusão, obtida por extracção de 5 g de planta (parte aérea seca previamente seccionada em pequenos pedaços) com 100 mL de água destilada em ebulição, durante 60 minutos. Ao fim desse tempo, o extracto aquoso foi filtrado em filtro de porcelana com papel de Whatman n.º4. Após arrefecimento, à temperatura ambiente, a infusão foi congelada e submetida a liofilização num liofilizador Heto Power Dry LL3000, tendo-se obtido 608 mg de extracto seco.

#### 2.1.3. Eluentes e reagentes

No decurso de toda a parte experimental foram utilizados reagentes de diferentes graus de pureza, consoante as exigências da metodologia escolhida. Assim, para o fraccionamento de compostos por cromatografia preparativa em coluna e para a preparação das fases móveis em cromatografia de camada fina analítica, usaram-se solventes puros (Panreac). Utilizaram-se solventes de qualidade p. a. (VWR) para a preparação da fase móvel em cromatografia de camada fina preparativa, bem como para a recuperação de produtos puros isolados a partir destas placas.

Foram ainda usados solventes de qualidade HPLC (FisherScientific) em cromatografia líquida de alta eficiência e nos ensaios de espectrometria de massa.

## 2.1.4. Análise e fraccionamento do extracto

Para a análise, fraccionamento e purificação dos compostos fenólicos existentes no extracto aquoso de *G.tenera* foram utilizadas técnicas cromatográficas analíticas, como a cromatografia em camada fina analítica (CCF), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), analítica e semi-preparativa, e técnicas de cromatografia preparativa, como a cromatografia em coluna (CC) sob pressão moderada e a cromatografia em camada fina preparativa (CCFP).

### 2.1.4.1. Cromatografia em camada fina analítica

Recorreu-se a esta técnica sempre que se pretendia:

- ter uma ideia global da composição do extracto bruto;
- escolher o eluente ou sistema de eluentes mais adequados para uma separação bem sucedida;
- controlar a composição de todas as fracções obtidas por CC.

As fracções que revelaram possuir a mesma composição foram adicionadas, a fim de simplificar a composição das amostras a serem analisadas e/ou purificadas por HPLC semi-preparativa.

#### 2.1.4.1.1. Características das placas

Foram utilizadas placas de alumínio com cobertura de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck: 1.05554.0001) de 20×20 cm, com 0,20 mm de espessura, e também placas de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel: 818333). Devido à maleabilidade do suporte de alumínio, as placas puderam ser dimensionadas à medida das necessidades.

#### 2.1.4.1.2. Aplicação da amostra e desenvolvimento das placas

Após a dissolução das amostras no solvente mais adequado, e na mínima quantidade possível do mesmo, fez-se a deposição com um capilar de vidro, a cerca de

1 cm da base inferior da placa. Após a secagem total da zona de aplicação, seguiu-se o desenvolvimento das placas com o eluente ou sistema de eluentes considerados mais apropriados para as amostras em estudo, em câmaras de vidro CAMAG, de dimensão adequada ao tamanho das placas, com desenvolvimento ascendente, previamente saturadas. Foram utilizados diversos sistemas de eluentes, tal como se mostra na tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Sistemas de eluição testados em CCF

Sistema de eluentes	Proporções
Diclorometano/Metanol	(5/1), (5/3)
Acetato de etilo/Metanol	(9/1), (9/2), (9/3), (9/4), (9/5), (9/6), (1/1), (4/1)
Acetato de etilo	(100)

#### 2.1.4.1.3. Visualização das manchas

Terminado o desenvolvimento (quando a altura percorrida pelo eluente se encontrava a cerca de 1 cm do topo da placa), as placas foram secas com auxílio de um secador de ar quente. As manchas foram, então, observadas em lâmpadas UV CAMAG a  $\lambda=254$  nm e  $\lambda=366$  nm, antes e após pulverização com o revelador  $H_2SO_4$  a 10% em etanol. Após a análise dos cromatogramas, houve o cuidado de resguardar as placas com material impermeável, para que estas não sofressem alterações ao longo do tempo.

#### 2.1.4.2. Cromatografia em coluna, sob pressão moderada

Recorreu-se à cromatografia em coluna sob pressão moderada (CC) para fraccionar o extracto aquoso da planta. As fracções resultantes de cada coluna foram novamente submetidas a CC, tantas vezes quantas necessário, para a obtenção de fracções de composição cada vez mais simples, para posterior purificação por HPLC semi-preparativa ou CCFP.

#### 2.1.4.2.1. Características das colunas

Foram utilizadas colunas de vidro pirex, de alturas e diâmetros variáveis, consoante a quantidade de amostra a fraccionar. À parte superior da coluna foi adaptado um sistema de entrada de ar comprimido para reduzir o tempo de eluição.

#### 2.1.4.2.2. Enchimento das colunas

Para o enchimento das colunas foi utilizada sílica gel 60 (0.015-0.040 mm, Merck: 1.09385.9025), e sílica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck: 9385), sendo a relação peso da amostra/peso de adsorvente de cerca de 1/40 (Shriner *et al.*, 1983).

Foi ainda utilizado como enchimento Sephadex LH-20 (GE Healthcare, Lote 10042455), tendo as colunas sido preparadas de acordo com o descrito por Houghton e Raman (1998):

- Utilizar 10 g de Sephadex LH-20 por 100 mg de extracto.
- Embeber o gel em metanol durante várias horas (3-4 horas) e de seguida empacotar a coluna.
- Passar um volume suficiente de metanol/água (4/1) pela coluna para substituir o metanol.

#### 2.1.4.2.3. Preparação das amostras

Cada amostra a fraccionar foi dissolvida num pouco de solvente (MeOH) e, após completa dissolução, a mesma foi colocada cuidadosa e uniformemente no topo da coluna. No caso das amostras fraccionadas em colunas de Sephadex LH-20, as mesmas foram dissolvidas numa mistura de metanol/água (4/1), numa proporção de 100 mg de extracto por 1,5 ml de solvente. Por fim, encheu-se a coluna com o eluente mais indicado e iniciou-se a eluição.

#### 2.1.4.2.4. Eluição

A eluição foi efectuada em gradiente de polaridade com misturas de diclorometano/metanol, e/ou acetato de etilo/metanol variando o volume das fracções recolhidas de 15 a 40 mL, consoante a quantidade de amostra a separar.

A composição das fracções foi controlada por CCF e as fracções que revelaram possuir a mesma composição foram adicionadas e evaporadas em evaporador rotativo, a 40 °C, sob vácuo, até resíduo seco.

As colunas de Sephadex LH-20 foram eluídas segundo a metodologia descrita por Houghton e Raman (1998):

- Eluir a coluna com metanol (100 ml por 100 mg de extracto).
- Eluir a coluna com acetona/água (1/1) (50 ml por 100 mg de extracto).

Segundo aqueles autores, o eluato de metanol irá conter o extracto livre de polifenóis e o eluato de acetona/água compreenderá o extracto com polifenóis.

O volume das fracções recolhidas variou entre 10 a 40 mL. No final de cada CC, foram realizadas várias CCF analíticas de forma a controlar a composição das diferentes fracções. As que revelaram possuir a mesma composição foram adicionadas e evaporadas até resíduo seco. Consoante a quantidade obtida e o número de manchas detectadas, assim foram encaminhadas para fraccionamento em novas CC, HPLC semi-preparativa ou CCFP.

#### 2.1.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

O sistema cromatográfico utilizado para a análise dos compostos fenólicos apresentava as seguintes características:

- Cromatógrafo líquido HPLC (Agilent 1100 series).
- Coluna de HPLC semi-preparativa (C<sub>18</sub>, 5µm, 150×7 mm, Alltima, GRACE)
- Software LC3D ChemStation (versão Ver.A.08 03)
- Detector de matriz de díodos (DAD)
- Fase móvel: Acetonitrilo / Água

Os cromatogramas foram registados a 290 nm e os diferentes compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de UV-Vis. de padrões existentes no laboratório. As condições experimentais foram as seguintes:

- Sistema eluente: água/ácido fórmico (0,4%) (solvente A) e acetonitrilo (solvente B);
- Sistema A: 0 min – 30% B, 15 min – 30% B, 20 min – 40% B, 30 min – 45% B, 50 min – 60% B, 60 min – 80% B, 65 min – 80% B, 80 min – 30% B; Fluxo: 3 mL/min;
- Sistema B: em regime isocrático de água/acetonitrilo (90%/10%) com fluxo de 3 mL/min;

O volume de injeção foi de 40  $\mu$ L e os cromatogramas foram registados a  $\lambda$ =290 nm.

#### *2.1.4.4. Cromatografia em camada fina preparativa*

Recorreu-se a esta técnica sempre que era necessário isolar um ou mais compostos provenientes das colunas cromatográficas que se mostrassem bem individualizados nas placas de CCF analítica. São tratadas por esta técnica as amostras disponíveis em quantidades inferiores a 20 mg.

##### 2.1.4.4.1. Características das placas preparativas

Foram utilizadas placas de vidro com cobertura de sílica-gel 60 F<sub>254</sub> (Merck: 1.05715.0001) de 20×20 cm e com 0,20 mm de espessura de camada adsorvente.

##### 2.1.4.4.2. Aplicação da amostra e desenvolvimento das placas

Após a dissolução das amostras no solvente mais adequado, e na mínima quantidade possível do mesmo, as amostras foram aplicadas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a 2 cm da base da placa. Após a secagem total da zona de aplicação,

seguiu-se o desenvolvimento das placas no sistema de eluentes Acetato de etilo/Metanol (9:1), o qual foi previamente testado por CCF analítica, em câmaras de vidro CAMAG, de desenvolvimento ascendente, com saturação.

#### 2.1.4.4.3. Visualização das manchas

Terminado o desenvolvimento (quando a altura percorrida pelo eluente se encontrava a cerca de 1 cm do topo da placa), as placas foram sujeitas a secagem completa com o auxílio de um secador de ar quente. As manchas foram observadas em lâmpadas UV CAMAG a  $\lambda=254$  nm e  $\lambda=366$  nm.

#### 2.1.4.4.4. Recuperação e conservação dos produtos puros

Delimitaram-se as manchas, sob a lâmpada de UV, e raspou-se a camada absorvente correspondente a cada uma, com ajuda de uma espátula. A sílica foi recolhida num gobelé rigorosamente limpo e pulverizada com a ajuda de uma vareta. Posteriormente, foi extraída com uma mistura (3x10mL) de didorometano/metanol (50:50), tendo a suspensão sido agitada durante cerca de 10 minutos. Seguiu-se a filtração sob vácuo, em filtro Chromafil® 0,45  $\mu$ m (Macherey-Nagel, Art.-Nr.729009) e evaporação à secura, em evaporador rotativo, sob vácuo e a baixa temperatura (40 °C).

*Obs:* A tentativa de isolamento de compostos puros recorrendo a esta técnica não foi bem sucedida, devido à pequena quantidade de compostos obtida.



## 2.1.5. Identificação estrutural dos compostos fenólicos

### 2.1.5.1. Espectroscopia de ultravioleta

Os espectros de absorção no UV foram obtidos no equipamento de HPLC-DAD e comparados com os espectros de compostos fenólicos já identificados em outras plantas da família das Leguminosas.

### 2.1.5.2. Espectrometria de massa

As fracções recolhidas por HPLC-DAD foram posteriormente analisadas por espectrometria de massa. Os espectros de massa foram obtidos recorrendo à técnica de ionização por *electrospray* (ESI-MS).

As amostras foram dissolvidas em metanol de qualidade HPLC (Carlo Erba) e acidificadas com 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, de forma a facilitar a protonação. Os espectros traçados foram obtidos utilizando um espectrómetro de massa do tipo *ion trap*, o LCQ Duo (Thermo Scientific, USA) equipado com uma fonte ESI. Os espectros foram traçados em modo negativo e a velocidade de fluxo da solução do *electrospray* foi de 5 µL/min. A voltagem aplicada no capilar foi de 10 V, a voltagem na fonte foi de 4,5 kV e a temperatura do capilar foi de 220°C.

As fracções obtidas por CC também foram analisadas por espectrometria de massa recorrendo igualmente à técnica de ionização por *electrospray* (ESI-MS), mas noutro equipamento e em diferentes condições.

As amostras foram dissolvidas em metanol de qualidade HPLC (Fisher Scientific) e os espectros obtidos recorrendo a um espectrómetro de massa do tipo triplo quadrupolo, com ionização à pressão atmosférica, o modelo Quattro Micro (Waters, USA), equipado com uma fonte ESI e com o software Masslynx. A velocidade de fluxo das soluções do *electrospray* para a fonte foi de 20 µL/min, sendo os espectros adquiridos nos modos de ionização, negativo e positivo. Para obter os espectros de massa tandem (ESI-MS/MS) usou-se argon como gás de colisão.

Os diferentes compostos fenólicos foram identificados através da razão massa/carga ( $m/z$ ) e das massas dos iões-fragmento a que deram origem, por comparação com valores já tabelados ou publicados em diversos artigos.

## 3. Resultados e Discussão

---

### 3.1. Estudo fitoquímico da infusão de *Genista tenera*

#### 3.1.1. Extracção e fraccionamento dos flavonóides

Foram obtidos 608 mg de extracto, segundo a metodologia descrita no ponto 2.1.1.

O extracto foi fraccionado por CC e por HPLC semi-preparativa, tendo sido recolhidas 124 fracções. Destas, foram seleccionadas as que possuíam um perfil fitoquímico mais simples com base no controlo efectuado por CCF analítica.

As condições de fraccionamento para cada coluna encontrando-se resumidas no Anexo A.

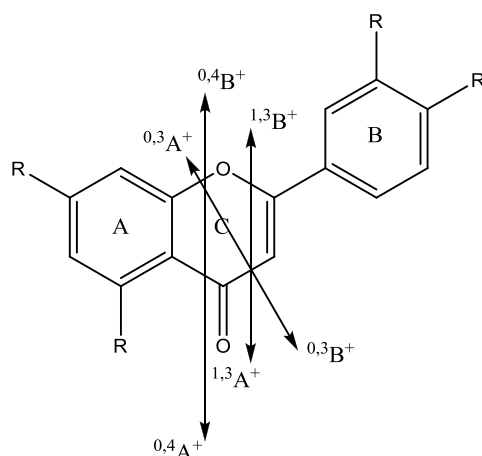
#### 3.1.2. Identificação dos flavonóides

Para a identificação dos compostos isolados, recorreu-se à espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV) e à espectrometria de massa (MS).

As fracções de composição mais simples, obtidas por CC e HPLC, foram analisadas por HPLC-DAD, HPLC-ESI-MS/MS, ESI-MS e ESI-MS/MS.

##### 3.1.2.1. Espectrometria de massa

No que diz respeito às fragmentações observadas na aglícona, a nomenclatura utilizada foi a proposta por M. Claeys e colaboradores (1997) e encontra-se esquematizada na figura 3.1.



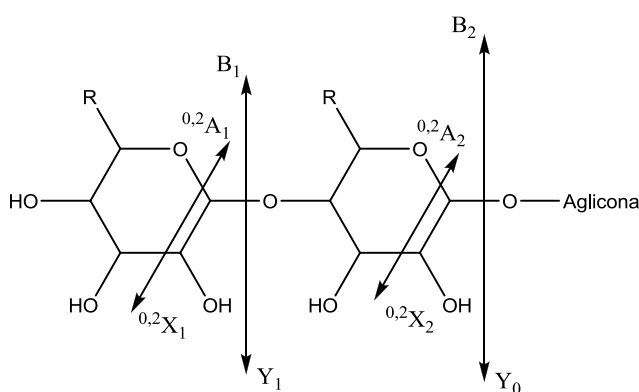
**Figura 3.1:** Nomenclatura das fragmentações da aglicona

De acordo com a nomenclatura, as designações  $^{i,j}A^+$  e  $^{i,j}B^+$  representam os iões-produto primários que contêm respectivamente os anéis A e B intactos. Os índices i e j referem-se às ligações do anel que são quebradas. As fragmentações para o modo negativo são análogas, sendo as de designações  $^{i,j}A^-$  e  $^{i,j}B^-$ .

Os iões  $^{i,j}A^+$  e/ou  $^{i,j}B^+$  podem perder pequenos fragmentos neutros (radicais ou moléculas), como por exemplo,  $H_2O$ ,  $CO$  e  $\cdot CH_3$ , designam-se as espécies resultantes por  $^{i,j}A^+-F$  e  $^{i,j}B^+-F$ , em que F representa o fragmento neutro perdido.

A perda de pequenos radicais e/ou moléculas neutras, por parte do ião molecular, é comum e constitui uma das principais fontes de informação sobre os substituintes ligados à aglicona. Para estes iões não existe nenhuma nomenclatura específica (Ma, 1999; Ma et al., 1997).

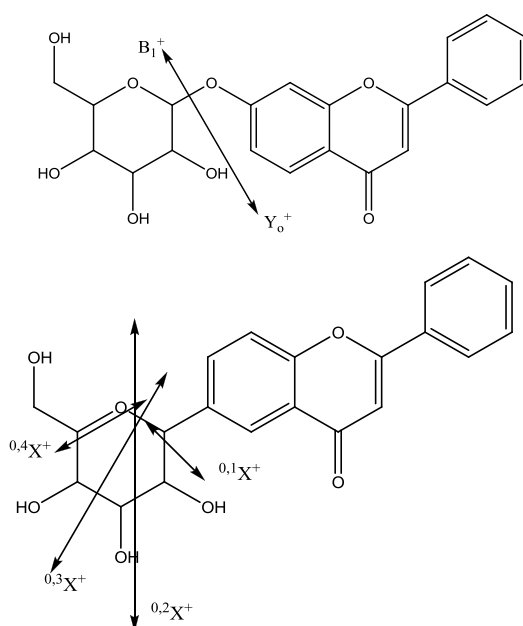
Relativamente aos derivados glicosídicos, adoptou-se a nomenclatura proposta por Domon e Costello (1988), esquematizada na figura 3.2.



**Figura 3.2:** Nomenclatura da parte glicosídica

As designações  $A_i^+$ ,  $B_i^+$  e  $C_i^+$  representam os iões-fragmento, em modo positivo, que contêm o grupo açúcar, ou parte dele, enquanto que  $X_i^+$  e  $Y_i^+$  representam fragmentos que ainda contêm a aglicona. Os índices superiores, quando presentes, indicam a ligação do glicósido que foi quebrada e os índices inferiores referem-se à parte do anel glícósídico que foi perdido.

A espectrometria de massa MS/MS também pode ser utilizada para diferenciar derivados *C*-glicosilados e *O*-glicósidos de flavonóides. As diferenças na fragmentação encontram-se esquematizadas na figura 3.3.



**Figura 3.3:** Nomenclatura das fragmentações em flavonóides *O*- e *C*-glicosilados

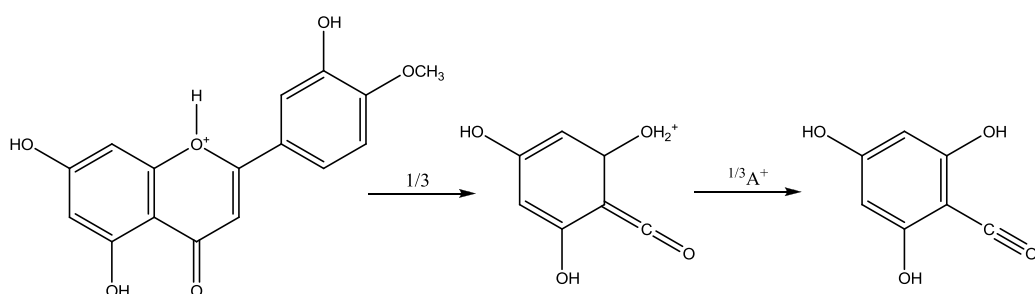
## 3.2. Caracterização dos flavonóides isolados

Os espectros de massa obtidos no presente trabalho foram remetidos para o Anexo B e seguidamente faz-se a discussão dos mesmos e o estudo da elucidação estrutural de cada um dos compostos.

### 3.2.1. Identificação do crisoeriol

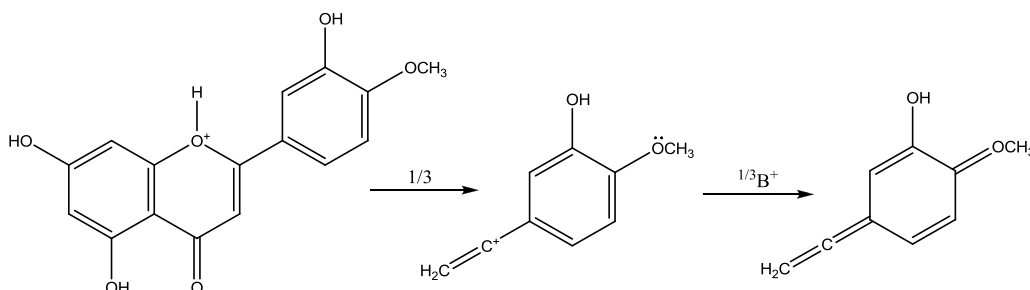
#### 3.2.1.1. Espectro de massa

No espectro de massa de ionização por *electrospray* (ESI-MS), modo positivo, verificou-se o aparecimento de um pico a  $m/z$  301.22, correspondente à espécie  $[M+H]^+$ , tendo permitido obter informação relativamente à massa molecular do composto (300 dalton), o qual foi identificado como sendo o crisoeriol. Tendo em vista a sua caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir das moléculas protonadas do crisoeriol. O pico a  $m/z$  151.10, correspondente a um fragmento resultante do mecanismo de fragmentação que envolve a cisão das ligações 1,3 do anel central, da qual resulta a formação dos iões do tipo  $^{1,3}A^+$  ( $m/z$  151) (Figura 3.4).



**Figura 3.4:** Mecanismo proposto para a formação dos iões do tipo  $^{1,3}A^+$

O mecanismo de fragmentação envolvendo a quebra das mesmas ligações conduz também à formação dos iões do tipo  $^{1,3}B^+$  ( $m/z$  148) (Figura 3.5).

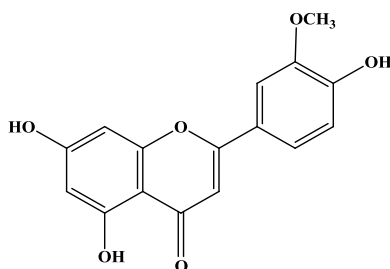


**Figura 3.5:** Mecanismo proposto para a formação dos iões do tipo  $^{1,3}B^+$

Estes mecanismos resultam de fragmentações do tipo *retro* Diels-Alder (RDA) e ocorrem uma vez que se formam iões estabilizados por ressonância.

### 3.2.1.2. Estrutura do composto identificado

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com a estrutura representada na figura 3.6, correspondente ao crisoeriol, o qual foi também anteriormente identificado como componente desta planta (Borges *et al.*, 2011)



**Figura 3.6:** Estrutura do crisoeriol

## 3.2.2. Identificação da Epicatequina

### 3.2.2.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray* (ESI-MS), em modo positivo, mostrou o aparecimento de dois picos a  $m/z$  291.14 e  $m/z$  272.25, correspondendo às espécies  $[M+H]^+$  e  $[M+H-H_2O]^+$ , respectivamente, tendo permitido obter informação relativamente à massa molecular deste composto (290 dalton). Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas protonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.1

**Tabela 3.1:** Principais íões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a  $m/z$  291

Íões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M+H]^+$	291	5
$[M+H-57]^+$	234	7
$^{0,3}B^+$	170	8
$^{0,3}B^+-CH_2$	156	28
$^{0,3}B^+-CH_2-CH$	143	47
$^{0,3}A^+$	122	10
$^{0,3}A^+-31$	91	100

O espectro de íões-produto traçado revelou um pico a  $m/z$  170, correspondente a um fragmento resultante do mecanismo de fragmentação que envolve a cisão das ligações 0,3 do anel central, da qual resulta a formação dos íões do tipo  $^{0,3}B^+$ .

O mecanismo de fragmentação envolvendo a quebra das mesmas ligações conduz também à formação dos íões do tipo  $^{0,3}A^+$  ( $m/z$  122). O esquema de fragmentação é análogo ao da cisão das ligações 1,3.

Estes mecanismos resultam de fragmentações do tipo *retro* Diels-Alder (RDA) e ocorrem uma vez que se formam íões estabilizados por ressonância.

O espectro de massa mostra ainda que os íões  $^{0,3}B^+$  podem sofrer fragmentação posterior e perder uma molécula de  $CH_2$  e uma de  $CH$ , resultando nas espécies  $^{0,3}B^+-CH_2$  e  $^{0,3}B^+-CH_2-CH$ , respectivamente.

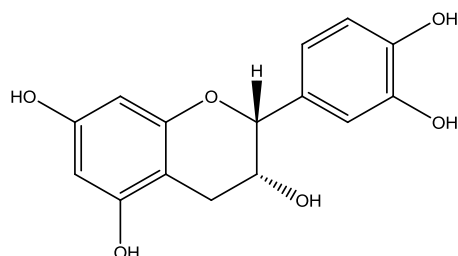
Esta amostra foi também analisada por HPLC-ESI-MS/MS tendo sido observado um pico intenso com um tempo de retenção  $t_r=1.82$  min. Nas mesmas condições analíticas, foi obtido um  $t_r=1.75$  min para o padrão catequina, o que nos leva a supor que não se trata deste composto, mas sim do seu isômero, epicatequina.

Embora estes valores de  $m/z$  correspondam à fragmentação da epicatequina, não foram encontrados dados na literatura que corroborem, inequivocamente, que se trata deste composto, pelo que se apresenta apenas uma proposta de estrutura para a massa molecular 290 dalton.



### 3.2.2.2. Estrutura do composto identificado

Os dados espectrais obtidos permitem-nos propor a estrutura representada na figura 3.7, correspondente à epicatequina.



**Figura 3.7:** Estrutura da epicatequina

## 3.2.3. Identificação da Apigenina

### 3.2.3.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção A<sub>10/13</sub>, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  269, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 270 dalton. Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.2.

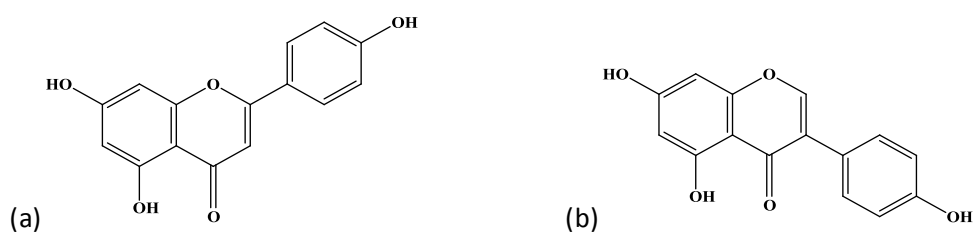
**Tabela 3.2:** Principais íões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a  $m/z$  269

Íões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	269.39	8
$[M-H-H_2O]^-$	251.29	19
$[M-H-CO]^-$	241.37	32
$[M-H-CO_2]^-$	225.14	100
$[M-H-C_3O_2]^-$	201.13	38
$[M-H-2CO_2]^-$	181.19	32
$[M-H-108]^-$	160.92	12
$^{1,4}B^-H_2$	149.03	7
$^{1,4}B^-H_2-2H_2O$	113.00	6

De acordo com Fabre *et al.* (2001), os picos a  $m/z$  269, 241, 225, 201, 181 e 149, correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $[M-H-CO]^-$ ,  $[M-H-CO_2]^-$ ,  $[M-H-C_3O_2]^-$ ,  $[M-H-2CO_2]^-$  e  $^{1,4}B^-H_2$ , respectivamente, com as abundâncias relativas que apresentaram no espectro de íões-produto, são típicos da apigenina, tornando-se inequívoca a sua presença na amostra. Ainda segundo Fabre *et al.* (2001), a genisteína apresenta também estes picos, mas com diferentes abundâncias. Como é descrito por este autor, uma maior abundância dos fragmentos a  $m/z$  241 e 181, leva a acreditar que a genisteína também está presente nesta amostra.

### 3.2.3.2. Estruturas dos compostos identificados

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com as estruturas abaixo representadas, que correspondem à apigenina e à genisteína.



**Figura 3.8:** Estruturas da apigenina (a) e da genisteína (b)

### 3.2.4. Identificação da biochanina A

#### 3.2.4.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção Ei-5, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  283, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 284 dalton. Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.3.

**Tabela 3.3:** Principais iões-produto observados no espectro de ESI-MS/MS a  $m/z$  283

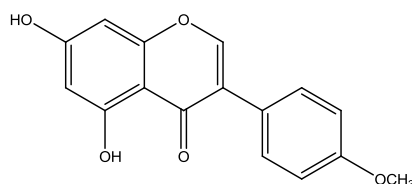
Iões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	283.31	43
$[M-H-CH_3]^-$	268.14	100
$[M-H-CH_3-H]^-$	267.01	59
$[M-H-CH_3-COH]^-$	239.07	68
$[M-H-CH_3-COH-20]^-$	219.20	25
$[M-H-CH_3-COH-56]^-$	183.00	33
$[M-H-CH_3-COH-60]^-$	178.91	8

Os fragmentos a  $m/z$  283, 268, 267 e 239, correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $[M-H-CH_3]^-$ ,  $[M-H-CH_3-H]^-$  e  $[M-H-CH_3-COH]^-$ , respectivamente, são apresentados por Vessecchi *et al.* (2011) como sendo do composto Biochanina A.

O espectro ESI-MS/MS realizado revelou ainda a presença de mais três picos, a  $m/z$  219, 183 e 179, que correspondem às espécies  $[M-H-CH_3-COH-20]^-$ ,  $[M-H-CH_3-COH-56]^-$  e  $[M-H-CH_3-COH-60]^-$ , respectivamente. Não foram encontradas referências na literatura para estes fragmentos, pelo que esta amostra carece de um estudo posterior mais aprofundado.

### 3.2.4.2. Estrutura do composto identificado

Grande parte dos dados espectrais obtidos estão de acordo com a estrutura abaixo representada, correspondente à Biochanina A.



**Figura 3.9:** Estrutura da biochanina A

## 3.2.5. Identificação da vitexina

### 3.2.5.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção Ei-1/2, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  431.12, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 432 dalton. Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.4.

**Tabela 3.4:** Principais iões-produto observados no espectro ESI-MS/MS a  $m/z$  431

Iões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	431.26	31
$[M-H-18]^-$	413.14	2
$^{0,3}X_0^-$	341.16	2.5
$^{0,2}X_0^-$	311.19	100
$^{0,2}X_0^- - H_2O$	283.40	1
$Y_0^-$	268.22	25

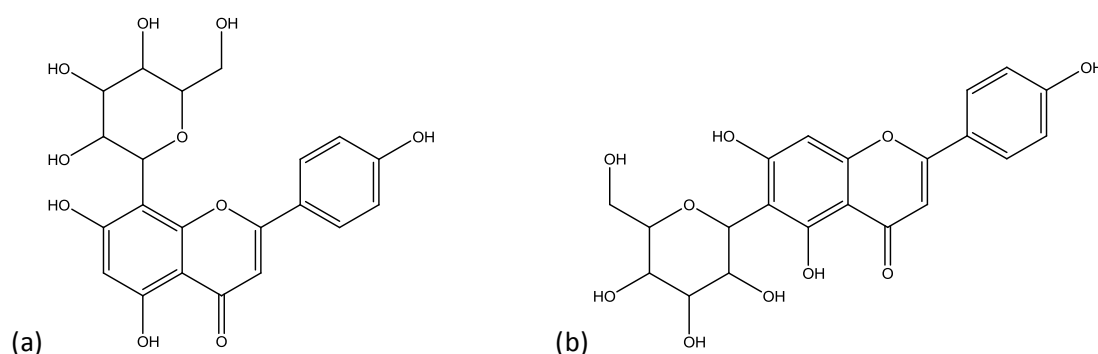
Segundo Ferreres *et al.* (2003), os picos a  $m/z$  431, 341 e 311, correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $[M-H-90]^-$  (ou  $^{0,3}X_0^-$ ) e  $[M-H-120]^-$  (ou  $^{0,2}X_0^-$ ), respectivamente, com as

abundâncias relativas que apresentaram no espectro de iões-produto, são típicos da vitexina, sugerindo a hipótese de que se trata deste composto. Ainda segundo Ferreres *et al.* (2003), a isovitexina (6-glucosilapigenina) apresenta ainda um pico a  $m/z$  413, correspondente à espécie  $[M-H-18]^-$ , que não aparece no espectro da vitexina (8-glucosilapigenina), o que leva a acreditar que a isovitexina também estará presente nesta amostra. Aliás, esta hipótese é confirmada pelos resultados apresentados por Iswaldi *et al.* (2011), que referenciam também o fragmento a  $m/z$  413 para a isovitexina.

A presença do pico a  $m/z$  268, correspondente à espécie  $Y_0^-$ , pode ser ainda indicativo da presença de um *O*-glucósido.

#### 3.2.5.2. Estruturas dos compostos identificados

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com as estruturas abaixo representadas, que correspondem às flavonas vitexina e isovitexina.



**Figura 3.10:** Estruturas da vitexina (a) e da isovitexina (b)

### 3.2.6. Identificação de 7-*O*-glucósido de genisteína

#### 3.2.6.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção Ei-6/11, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  431, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 432 dalton. Tendo em vista a sua

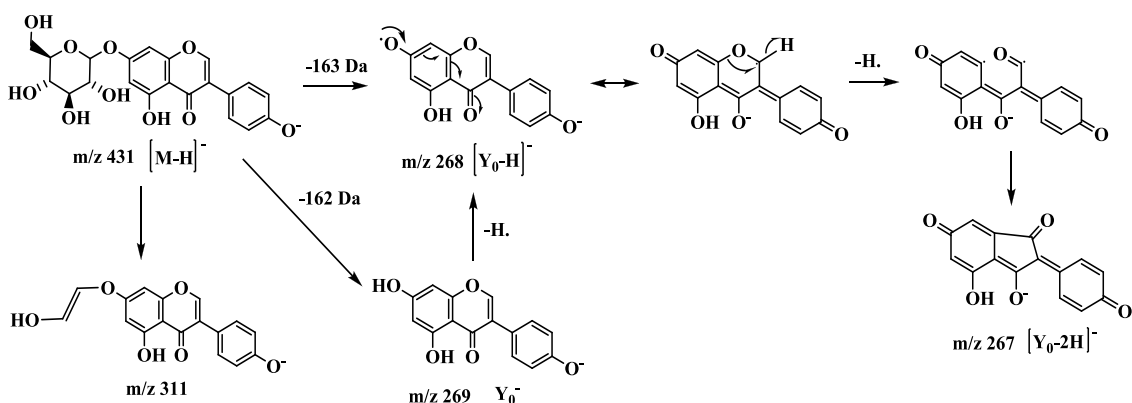
identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Principais iões-produto observados no espectro ESI-MS/MS a  $m/z$  431

Iões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	431.28	32
$[M-H-44]^-$	386.96	2
$^{0,3}X_0^-$	341.22	3
$^{0,2}X_0^-$	311.20	100
$^{0,2}X_0^- - H_2O$	283.31	2
$[Y_0-H]^-$	268.26	16

Segundo Ablajan *et al.* (2011), os picos a  $m/z$  431, 311 e 268 correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $^{0,2}X_0^-$  (ou  $[M-H-120]^-$ ) e  $[Y_0-H]^-$  respectivamente, são típicos da isoflavona 7-*O*-glucósido de genisteína, sugerindo tratar-se deste composto.

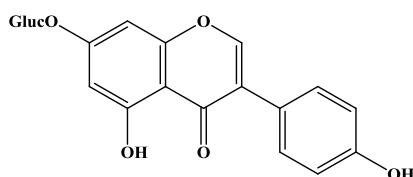
O pico a  $m/z$  268 é explicado pelo facto de, no composto 7-*O*-glucósido de genisteína, a formação do ião radical ocorre no anel B, sabendo-se também que a formação do ião a  $m/z$  268 indica que este radical possui um papel importante na fragmentação de isoflavonas substituídas. O mecanismo de fragmentação do ião  $[M-H]^-$  no modo negativo de ESI-MS<sup>n</sup> é evidenciado na figura 3.11.



**Figura 3.11:** Mecanismo de fragmentação do ião  $[M-H]^-$  de 7-*O*-glucósido de genisteína no modo negativo (Ablajan *et al.*, 2011)

### 3.2.6.2. Estrutura do composto identificado

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com a estrutura abaixo representada, que corresponde a 7-*O*-glucósido de genisteína.



**Figura 3.12:** Estrutura de 7-*O*-glucósido de genisteína

## 3.2.7. Identificação de 7-*O*-glucósido de orobol e/ou 8-glucosilorobol e/ou 7-*O*-glucósido de luteolina

### 3.2.7.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção Ei-6/11, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  447, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 448 dalton. Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.6.

**Tabela 3.6:** Principais íões-produto observados no espectro ESI-MS/MS a  $m/z$  447

Íões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	447.35	19
$[M-H-H_2O]^-$	429.05	16
$[M-H-CH_3OH]^-$	415.20	10
$^{0,4}X_0^-$	387.13	8
$^{0,3}X_0^-$	357.13	4
$^{0,2}X_0^-$	327.18	28
$Y_0^-$	285.27	100
$[Y_0^-CH_2]^-$	271.03	6
$Y_0^-52$	233.02	36
$Y_0^-94$	191.09	35
$Y_0^-112$	173.02	11

Segundo Ablajan *et al.* (2011), os picos a  $m/z$  447, 387, 357 e 327 correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $^{0,4}X_0^-$  (ou  $[M-H-60]^-$ ),  $^{0,3}X_0^-$  (ou  $[M-H-90]^-$ ) e  $^{0,2}X_0^-$  (ou  $[M-H-120]^-$ ), respectivamente, são típicos de um derivado C-glucosilado, levantado a hipótese de que se trata do composto 8-glucosilorobol. Aliás, esta hipótese é confirmada por Edwards *et al.* (2006). O fragmento a  $m/z$  415, que corresponde à espécie  $[M-H-CH_3OH]^-$ , reforça a hipótese de se tratar de um derivado C-glucosilado.

Ainda segundo o mesmo autor, o pico a  $m/z$  285, correspondente à espécie  $Y_0^-$ , como pico base, pode indicar-nos que há uma perda directa de um açúcar, fragmentação típica de um O-glucósido. Estes dados corroboram a hipótese do composto ser um O-glucósido.

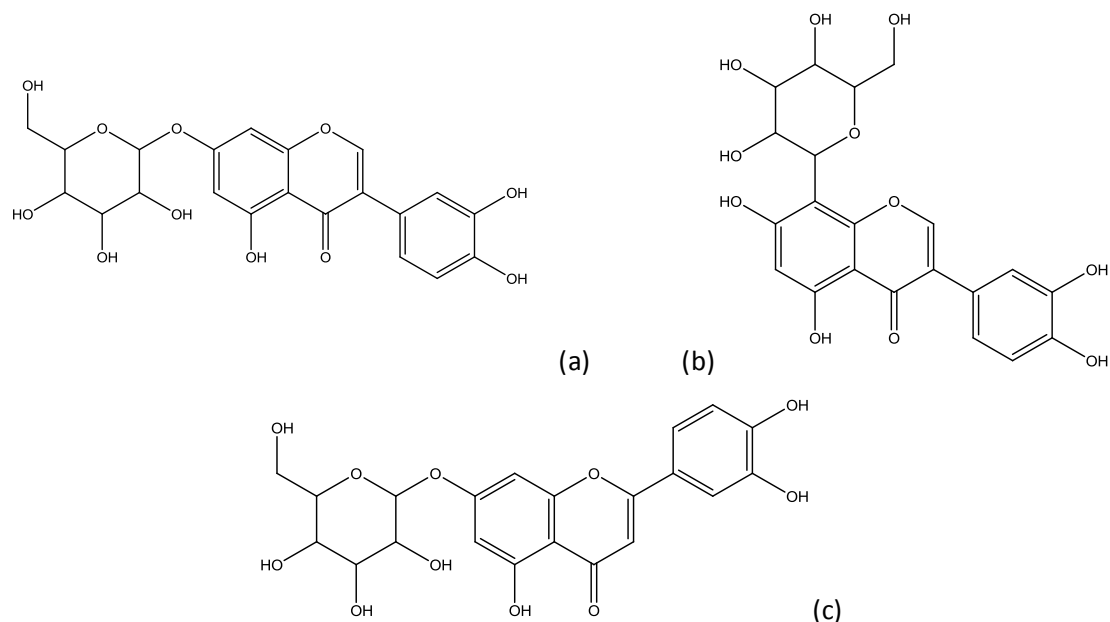
Segundo Marques *et al.* (2009), os picos a  $m/z$  447 e 285, correspondentes às espécies  $[M-H]^-$  e  $Y_0^-$ , respectivamente, podem ser indicativos da presença da flavona 7-O-glucósido de luteolina.

Não foram encontrados dados na literatura que confirmem a hipótese de estarmos em presença de glucósidos de orobol ou glucósido de luteolina, pelo que, 7-O-glucósido de orobol, 8-glucosilorobol e 7-O-glucósido de luteolina, são apenas propostas de estruturas para a massa molecular de 448 dalton.



### 3.2.7.2. Estruturas dos compostos identificados

Os dados espectrais obtidos estão de acordo com as estruturas abaixo representadas, que correspondem às isoflavonas 7-*O*-glucósido de orobol e/ou 8-glucosilorobol e à flavona 7-*O*-glucósido de luteolina.



**Figura 3.13:** Estruturas das isoflavonas 7-*O*-glucósido de orobol (a) e 8-glucosilorobol (b) e da flavona 7-*O*-glucósido de luteolina (c)

## 3.2.8. Identificação da luteolina *O*-, *C*-glucosilada

### 3.2.8.1. Espectro de massa

O espectro de massa de ionização por *electrospray*, em modo negativo, da fracção Ei-1/2, mostrou o aparecimento de um pico a  $m/z$  609, atribuindo-se o mesmo a uma molécula desprotonada de massa molecular 610 dalton. Tendo em vista a sua identificação e caracterização estrutural, foi traçado o espectro de massa de iões-produto, obtido a partir de moléculas desprotonadas e sumariamente interpretado na tabela 3.7.

**Tabela 3.7:** Principais iões-produto observados no espectro ESI-MS/MS a  $m/z$  609

Iões	$m/z$	Abundância relativa (%)
$[M-H]^-$	609.41	12
$[M-H-H_2O]^-$	591.01	7
$[M-H-44]^-$	565.10	8
$^{0,3}X_0^-$	520.70	8
$^{0,2}X_0^-$	489.11	15
$Y_0^-$	447.15	100
$Y_0^- - 8$	439.36	4
$[Y_0^- - CH_2]^-$	339.22	2
$Y_0^- - ^{0,2}X_0^-$	327.15	5
$2Y_0^-$	285.10	5

Segundo Ablajan *et al.* (2011), e analogamente aos resultados apresentados, os picos a  $m/z$  609, 520 e 489 correspondentes às espécies  $[M-H]^-$ ,  $^{0,3}X_0^-$  (ou  $[M-H-90]^-$ ) e  $^{0,2}X_0^-$  (ou  $[M-H-120]^-$ ), respectivamente, são típicos de um derivado C-glucosilado, colocando-se a hipótese de que há quebra de um grupo glucosilo sem a quebra do glucósido. Ainda segundo o mesmo autor, o pico a  $m/z$  447, correspondente à espécie  $Y_0^-$ , como pico base, pode indicar-nos que há uma perda directa de um açúcar, fragmentação típica de um O-glucósido. Em face destes dados, poderá colocar-se a hipótese de se tratar de um glucósido C-glucosilado noutra posição.

O fragmento a  $m/z$  327, correspondente à espécie  $Y_0^- - ^{0,2}X_0^-$ , indica-nos que existiu uma quebra do glucosilo depois da quebra do glucósido. Já o fragmento a  $m/z$  285, que corresponde à espécie  $2Y_0^-$ , pode ser devido à cisão de um glucósido, já depois da quebra do glucosilo.

Segundo Marques *et al.* (2009), e pelos valores apresentados por estes autores, trata-se uma luteolina glucosilada, mas não foram encontrados dados na literatura que elucidem sobre a posição do glucosilo e do glucósido, pelo que apenas é proposta uma estrutura de luteolina O-,C-glucosilada para a massa molecular de 610 dalton.

## 4. Considerações Finais

---

A espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS) é uma técnica analítica poderosa para a elucidação estrutural de muitos compostos orgânicos, incluindo os flavonóides. Ainda que, por si só, não conduza à identificação inequívoca de um dado composto, esta técnica permite propor um conjunto restrito de estruturas para uma dada massa molecular, com base no padrão de fragmentação obtido. Tanto assim é que, no presente trabalho, deparámo-nos com estruturas distintas para  $[M-H]^-$  a  $m/z$  269 (apigenina e/ou genisteína), a  $m/z$  431 (vitexina e/ou isovitexina), a  $m/z$  447 (7-*O*-glucósido de luteolina e/ou 7-*O*-glucósido de orobol e/ou 8-glucosilorobol) e a  $m/z$  609 (3',7-di-*O*-glucósido de luteolina, di-*O*-glucósido de luteolina, ou luteolina *O*-,*C*-glucosilada). Esta técnica revelou-se extraordinariamente importante para análise de amostras para as quais não se dispunha de quantidade suficiente para serem sujeitas a outras técnicas analíticas. Relativamente às amostras obtidas em maior quantidade, serão necessárias novas cromatografias em coluna, com o objectivo de se isolarem produtos puros em quantidade suficiente para serem analisados por técnicas de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais. O conjunto dos dados obtidos por ESI-MS e por RMN, aliados aos espectros de UV dos compostos isolados, permitirá a identificação inequívoca dos compostos presentes na infusão de *Genista tenera*. Esta será a etapa seguinte do presente trabalho cujo objectivo final será relacionar a composição química da infusão com as propriedades antidiabéticas atribuídas a esta planta. O trabalho aqui desenvolvido constituiu um complemento a estudos anteriormente efectuados com os extractos de éter dietílico, acetato de etilo e *n*-butanol de flavonóides, que se revelaram muito promissores do ponto de vista da sua bioactividade.

## 5. Referências Bibliográficas

---

- Ablajan, K.; (2011); *A study of characteristic fragmentation of isoflavonoids by using negative ion ESI-MS<sup>n</sup>*; Journal of Mass Spectrometry; **46**: 77-84
- Balasundram, N; Sundram, K e Samman, S; (2006); *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*; Food Chemistry; **99**: 191–203
- Borges, C.; Martinho, P.; Martins, A.; Rauter, A. P. e Ferreira, M. A. Almoester; (2001); *Structural characterisation of flavonoids and flavonoid-O-glycosides extracted from Genista tenera by fast-atom bombardment tandem mass spectrometry*; Rapid Communications in Mass Spectrometry; **15**: 1760-1767
- Boumaza, O.; Mekkiou, R.; Seghiri, R.; Sarri, D.; Benayache, S.; Garcia, V.P.; Bermejo, J. e Benayache, F.; (2006); *Flavonoids and isoflavonoids from Genista tricuspidata*; Chemistry of Natural Compounds; **42 (6)**: 730-731
- Bruneton, J.; (1999); *Composés phénoliques, shikimates, acétates*. In: Editions TEC & DOC, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales; Paris
- Campos, M.G.; (2005); Flavonóides. In: Proença da Cunha, A. (Coor.); *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp 237-289; Ed. Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa
- Domon, B. e Costello, C.; (1988); *A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates*; Glycoconjugate Journal; **5**: 397-409
- Edwards, E. L., Rodrigues, J. A., Ferreira, J., Goodall, D. M., Rauter, A. P., Justino, J. e Thomas-Oates, J.; (2006); *Capillary electrophoresis-mass spectrometry characterisation of secondary metabolites from the antihyperglycaemic plant Genista tenera*; Electrophoresis, **27**, 2164–2170

- Erdemoglu, N.; Ozkan, S.; Duran, A.; Tosun, F.; (2009); *GC-MS analysis and antimicrobial activity of alkaloid extract from Genista vuralii*; *Pharmaceutical Biology*; **47 (7)**: 81-85
  
- Erdemoglu, N.; Tosun, F. e Eroglu, Y.; (2006); *LC-MS analysis of daidzein in the Turkish Genista species*; *Chemistry of Natural Compounds*; **42 (5)**: 517-519
  
- Fabre, N.; Rustan, I.; Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J.; (2001); *Determination of Flavone, Flavonol and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry*; *Journal of American Society of Mass Spectrometry*; **12**: 707-715
  
- Ferreres, F.; Silva, B.M.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M. e Ferreira, M.A.; (2003); *Approach to the Study of C-glycosyl Flavone by Ion Trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to Seeds of Quince (Cydonia oblonga)*; *Phytochemical Analysis*; **4**: 352-359
  
- Garritano, S.; Pinto, B.; Giachi, I.; Pistelli, L. e Reali, D.; (2005); *Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an in vitro short-term test*; *Phytomedicine*; **12 (1-2)**: 143-147
  
- Giachi, I.; Manunta, A.; Morelli, I. e Pistelli, L.; (2002); *Flavonoids and isoflavonoids from Genista morisii*; *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**: 801–803
  
- Hanganu, D.; Vlase, L. e Olah, N.; (2010); *Phytochemical Analysis of Isoflavons from some Fabaceae species extracts*; *Natulae Botanicae Horti Agrobotanici, Cluj-Napoca*; **38(1)**: 57-60
  
- Harborne, J.B.; (1994); *Phytochemistry of the Leguminosae*. In: Bisby, F.A.; Buckingham, J.; Harborne, J.B. (Ed); *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*; Chapman and Hall; London; pp. xx-xxiii

- Houghton, P. J., Raman, A.; (1998); *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*, pp 47-49. Ed. Chapman and Hall; Great Britain.
  
- Heinrich, M.; Barnes, J.; Gibbons, S e Williamson, E.M.; (2004); *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*; Churchill Livingstone; Elsevier Science; pp. 4-259
  
- Iswaldi, I.; Arráez-Román, D.; Rodríguez-Medina, I.; Beltrán-Debón, R.; Joven, J.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; (2011); *Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (Aspalathus linearis) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT)*; Analytical and Bioanalytical Chemistry; **400**: 3643-3654
  
- Jardim, R.; Francisco, D.; (2000); *Flora endémica da Madeira*; Múchia Publicações; Funchal
  
- Lopes, R. M.; Toledo de Oliveira, T.; Nagem, T. J. e Pinto, A. S.; *Flavonóides - Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidémico em animais experimentais*; Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento
  
- Luczkiewicz, M.; Glód, D.; Baczek, T. e Buciński, A.; (2004); *LC-DAD UV and LC-MS for the analysis of isoflavones and flavones from in vitro and in vivo biomass of Genista tinctoria*; Chromatographia; **60**: 179-185
  
- Ma, Y.; (1999); *Development and application of mass spectrometric methods for the structural characterization of flavonoid glycosides and other biologically active natural products*; PhD. Thesis; Faculteit Medische en Farmaceutische Wetenschappen; Universiteit Antwerpen
  
- Ma, Y.; Li, Q.M.; Van den Heuvel, H. e Claeys, M.; (1997); *Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry*; Rapid Communications in Mass Spectrometry; **11**: 1357-1364

- Madeira, P. J. A., Rosa, A. M., Xavier, N. M., Rauter, A. P. e Florêncio, M. H.; (2010); *Electrospray ionization mass spectrometric analysis of newly synthesized  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactones fused to sugars*; Rapid Communication of Mass Spectrometry; **24**: 1049–1058
  
- Markham, K.R.; (1989); *Flavones, flavonols and their glycosides*. In: Harborne, J.B. (Ed) Methods in Plant Biochemistry; **Vol.1**; Academic Press; London; pp. 197-235
  
- Markham, K.R.; (1982); *Techniques of Flavonoids Identification*; Academic Press Ltd.; London
  
- Marques, R.; Sousa, M.M.; Oliveira, M.C.; Melo, M.J.; (2009); *Characterization of weld (*Reseda luteola* L.) and spurge flax (*Daphne gnidium* L.) by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry in Arraiolos historical textiles*; Journal of Chromatography A; **1216**: 1395-1402
  
- Martins, A.; (2006); *Contribuição para o estudo Fitoquímico e Farmacológico da Flora Endémica do Arquipélago da Madeira: Flavonóides e Alcalóides de *Genista tenera**; Tese de doutoramento; DQB-FCUL; Lisboa
  
- Martins, A.; Wink, M.; Tei, A.; Brum-Bousquet, M.; Tillequin, F. e Rauter, A. P.; (2005); *A Phytochemical Study of the Quinolizidine Alkaloids from *Genista tenera* by Gas Chromatography–Mass Spectrometry*; Phytochemical Analysis; **16**: 264–266
  
- Percy, D. M. e Cronk, Q. C. B.; (2002); *Different fates of Island Brooms: Contrasting evolution in *Adenocarpus*, *Genista*, and *Teline* (Genisteae, Fabaceae) in the Canary Islands and Madeira*; American Journal of Botany; **89**(5): 854–864.
  
- Polhill, R. M.; (1994); *Classification of the Leguminosae*. In: Bisby, F. A.; Buckingham, J. e Harborne, J. B. (Eds.); Phytochemical Dictionary of the Leguminosae; Chapman and Hall, London; pp. xxx-xiii

- Proença da Cunha, A.; Ribeiro, J. A.; Roque, O. R.; (2007a); *Plantas Aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilizações*, Edição da Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa
  
- Proença da Cunha, A.; Teixeira, F.; Pereira da Silva, A.; Roque, O. R.; (2007b); *Plantas na Terapêutica – Farmacologia e ensaios clínicos*; pp 15-40; Ed. Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa
  
- Proença da Cunha, A.; Roque, O.R.; (2005); *Compostos Fenólicos :Características e Origem Biossintética* in: Proença da Cunha, A. (Coor.); *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp 211-224; Ed. Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa
  
- Rauter, A. P.; Martins, A.; Borges, C.; Ferreira, J.; Justino, J.; Bronze, M. R.; Coelho, A. V.; Choi, Y. H. e Verpoorte, R.; (2005); *Liquid chromatography–diode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry/nuclear magnetic resonance analyses of the anti-hyperglycemic flavonoid extract of Genista tenera: Structure elucidation of a flavonoid-C-glycoside*; Journal of Chromatography A, **1089**: 59–64
  
- Rauter, A. P.; Martins, A.; Lopes, R.; Ferreira, J.; Serralheiro, L. M.; Araújo, M. E.; Borges, C.; Justino, J.; Silva, F. V.; Goulart, M.; Thomas-Oates, J.; Rodrigues, J. A.; Edwards, E.; Noronha, J. P.; Pinto, R. e Mota-Filipe, H.; (2009); *Bioactivity studies and chemical profile of the antidiabetic plant Genista tenera*; Journal of Ethnopharmacology, **122**: 384–393
  
- Serrilli, A. M.; Graziosi, V.; Ballero, M.; Foddis, C.; Serafini, M.; Poli, F.; Scartezzini, P. e Bianco, A.; (2010); *Endemic Sardinian plants: the case of Genista cadasonensis Valsecchi*; Natural Product Research; **24 (10)**: 942-947
  
- Tapas, A. R.; Sakarkar, D. M.; Kakde, R. B.; (2008); *Flavonoids as Nutraceutical: A Review*; Tropical Journal of Pharmaceutical Research; **7 (3)**: 1089-1099



- Van Rensen, I.; Veit, M.; Van Rensen, U.R.; Cantó, P.; Vogt, H.; Greinwald, R. e Czygan, F.C.; (1999); *Line-scatter plots in chemotaxonomy of Genista L. Section Spartioides SPACH in Western Europe*; Biochemical Systematics and Ecology; **27**: 687-708
  
- Van Sumere, C.F.; (1989); *Phenols and phenolic acids*. In: Methods in plant biochemistry; vol.1: plant phenolics; Dey, P.M. e Harborne, J.B. (Ed); Academic Press; London
  
- Vessecchi, R.; Zocolo, G.J.; Gouvea, D.R.; Hübner, F.; Cramer, B.; Rodrigues de Marchi, M.R.; Humpf, H.U. e Lopes, N.P.; (2011); *Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies*; Rapid Communication of Mass Spectrometry; **25**: 2020-2026
  
- Vitor, R.M.F.; (2003); *Caracterização química do decocto de flores de carqueja e estudo do seu efeito protector do endotélio*; Tese de mestrado; Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; Lisboa
  
- Waterman, P.G. e Mole, S.; (1994); *Qualitative and quantitative separation methods*. In: Analysis of phenolic plant metabolites; Lawton, J.B. e Likens, G.E. (Ed); Blackwell Scientific Publications; Oxford
  
- Williams, C.A. e Harborne, J.B.; (1989); *Isoflavonoids*. In: Harborne, J.B. (Ed); Methods in Plant Biochemistry; **Vol.1**; Academic Press; London; pp. 421-449
  
- Ying, C.; Hsu, J.T. e Shieh, S.C.; (2001); *Growth inhibition of human endothelial cells by phyto-oestrogen biochanin A, a metabolite of genistein*; British Journal of Nutrition; **85**: 615-620

## Anexos

---

## Anexo A: Tabelas de registo de colunas cromatográficas

**Tabela A.1:** Registo da coluna cromatográfica A

<b>Parâmetros</b>	<b>Registo</b>	<b>Observações</b>
<b>Referência</b>	Coluna A (Aq.)	Extracto liofilizado
<b>Material a fraccionar</b>	Extracto aquoso liofilizado	→ preparado a partir da infusão de <i>Genista tenera</i>
<b>Quantidade</b>	0,608 g	
<b>Enchimento</b>	Sílica gel de fase normal	
<b>Altura</b>	15,5 cm	Kieselgel 60
<b>Diâmetro</b>	2,5 cm	0,040-0,063 mm
<b>Cabeça</b>	Não	Merck – 1.09385.9025
<b>Eluição:</b>		A <sub>1</sub> → Diclor.
<b>Nº total de fracções</b>	18	A <sub>2</sub> a A <sub>3</sub> → Diclor./MeOH (5/1)
<b>Volume médio</b>	30-40 mL	A <sub>4</sub> → Diclor./MeOH (4/1)
<b>Programa de eluição</b>	Diclorometano	A <sub>5</sub> a A <sub>9</sub> → Diclor./MeOH (3/1)
	Diclorometano / MeOH	A <sub>10</sub> a A <sub>11</sub> → Diclor./MeOH (2/1)
	MeOH / Diclorometano	A <sub>12</sub> → Diclor./MeOH (1/1)
	MeOH	A <sub>13</sub> → Diclor./MeOH (1/2)
		A <sub>14</sub> a A <sub>17</sub> → Diclor./MeOH (1/4)
		A <sub>18</sub> → MeOH
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC:	→ HPLC:
	A <sub>1</sub>	A <sub>1</sub>
	A <sub>2/3</sub>	A <sub>2/3</sub>
	A <sub>4</sub>	A <sub>4</sub>
	A <sub>5/6</sub>	A <sub>5/6</sub>
	A <sub>7/8</sub>	A <sub>7/8</sub>
	A <sub>9</sub>	A <sub>9</sub>
	A <sub>10/13</sub>	A <sub>10/13</sub>
	A <sub>14/15</sub>	A <sub>14/15</sub>
	A <sub>16/18</sub>	A <sub>16/18</sub>

**Tabela A.2:** Registo da coluna cromatográfica B

<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>  <b>Material a fraccionar</b>  <b>Quantidade</b>	Coluna B  Amostras obtidas por coluna preparativa 8 Amostras	→ Obtidas de uma amostra inicial por coluna preparativa
<b>Enchimento</b>  <b>Altura</b>  <b>Diâmetro</b>  <b>Cabeça</b>	Coluna de HPLC semi-preparativa C <sub>18</sub> , 5µm 150 mm  7 mm  Não	Fase móvel: Acetonitrilo e água/ácido fórmico a 0,4%
<b>Eluição:</b>  <b>Nº total de fracções</b>  <b>Volume médio</b>  <b>Programa de eluição</b>	31 fracções  40 µL com Fluxo de 3 mL/min  Sistema A: Sistema H <sub>2</sub> O/ACN (70/30) Sistema B: Sistema H <sub>2</sub> O/ACN (90/10)	A <sub>2/3</sub> → Sistema A A <sub>4</sub> → Sistema A 1ª Fracção → Sistema B A <sub>5/6</sub> → Sistema A A <sub>7/8</sub> → Sistema A A <sub>9</sub> → Sistema A A <sub>10/13</sub> → Sistema A A <sub>14/15</sub> → Sistema A e sistema B A <sub>16/18</sub> → Sistema A
<b>Fracções reunidas</b>	A <sub>2/3</sub> → 3 fracções A <sub>4</sub> → 4 fracções A <sub>5/6</sub> → 3 fracções A <sub>7/8</sub> → não se recolheram fracções A <sub>9</sub> → 3 fracções A <sub>10/13</sub> → 3 fracções A <sub>14/15</sub> → 4 fracções A <sub>16/18</sub> → 3 fracções	→ Testada com Sistema B, obtiveram-se 3 fracções  → Muito idêntica à A <sub>5/6</sub>  → Com Sistema A era muito complexa → Testou-se Sistema B

**Tabela A.3:** Registo da coluna cromatográfica Di

<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>	Coluna Di	
<b>Material a fraccionar</b>	Amostra A <sub>5/6</sub> do extracto aquoso (G.t. aq A <sub>5/6</sub> )	→ Amostra obtida por coluna preparativa
<b>Quantidade</b>	177,4 mg	
<b>Enchimento</b>	Sephadex LH-20	
<b>Altura</b>	20 cm	Lote 10042455
<b>Diâmetro</b>	2,5 cm	Pack 239064
<b>Cabeça</b>	Não	GE Healthcare
<b>Eluição:</b>	Fracção A <sub>5/6</sub>	
<b>Nº total de fracções</b>	19 fracções	
<b>Volume médio</b>	≈ 20 mL	
<b>Programa de eluição</b>	MeOH Acetona/Água (1/1) MeOH	MeOH → Di-1 a Di-12 Acetona/Água (1/1) → Di-13 a Di-18 MeOH → Di-19
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC: Di-1/2 Di-3 Di-4/6 Di-7/10 Di-11/15 Di-16/19	→ Fracções Di-1/2, Di-3 e Di-4/6 reunidas para realizar outra coluna preparativa de sílica gel (Fi)  → Fracções Di-11/15 e Di-16/19 reunidas

**Tabela A.4:** Registo da coluna cromatográfica Ei

<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>  <b>Material a fraccionar</b>  <b>Quantidade</b>	Coluna Ei  Amostras A <sub>10/13</sub> e A <sub>14/15</sub> do extracto aquoso (G.t. aq A <sub>10/13</sub> com A <sub>14/15</sub> ) 54,6 mg	→ Amostras obtida por coluna preparativa
<b>Enchimento</b>  <b>Altura</b>  <b>Diâmetro</b>  <b>Cabeça</b>	Sephadex LH-20  20 cm  2,5 cm  Não	Lote 10042455 Pack 239064 GE Healthcare
<b>Eluição:</b>  <b>Nº total de fracções</b>  <b>Volume médio</b>  <b>Programa de eluição</b>	Fracções A <sub>10/13</sub> + A <sub>14/15</sub>  11 fracções  ≈ 15 mL  MeOH Acetona/Água (1/1) MeOH	MeOH → Ei-1 a Ei-6 Acetona/Água (1/1) → Ei-7 a Ei-10 MeOH → Ei-11
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC: Ei-1/2 Ei-3/4 Ei-5 Ei-6/11	→ Fracções sujeitas a caracterização por HPLC-MS

**Tabela A.5:** Registo da coluna cromatográfica Fi

<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>	Coluna Fi	
<b>Material a fraccionar</b>	Amostras Di-1/2, Di-3 e Di-4/6 (G.t. aq Di-1/2 + Di-3 + Di-4/6)	→ Amostras obtidas por coluna de Sephadex LH-20 (Di)
<b>Quantidade</b>	141,5 mg	
<b>Enchimento</b>	Sílica gel de fase normal	
<b>Altura</b>	13,5 cm	Kieselgel 60 0,040-0,063 mm Merck – 1.09385.9025
<b>Diâmetro</b>	2 cm	
<b>Cabeça</b>	Não	
<b>Eluição:</b>	Fracções Di-1/2 + Di-3 + Di-4/6	AcOEt → Fi-1 a Fi-4 AcOEt/MeOH (9/1) → Fi-5 a Fi-7 AcOEt/MeOH (9/2) → Fi-8 a Fi-11 AcOEt/MeOH (9/3) → Fi-12 a Fi-14 AcOEt/MeOH (9/4) → Fi-15 a Fi-17 AcOEt/MeOH (9/6) → Fi-18 a Fi-20 AcOEt/MeOH (9/8) → Fi-21 a Fi-23 AcOEt/MeOH (9/9) → Fi-24 a Fi-26 MeOH → Fi-27
<b>Nº total de fracções</b>	27 fracções	
<b>Volume médio</b>	≈ 20 mL	
<b>Programa de eluição</b>	AcOEt AcOEt/MeOH (9/1) AcOEt/MeOH (9/2) AcOEt/MeOH (9/3) AcOEt/MeOH (9/4) AcOEt/MeOH (9/6) AcOEt/MeOH (9/8) AcOEt/MeOH (9/9) MeOH	
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC: Fi-1/3 Fi-4/5 Fi-6/8 Fi-9/10 Fi-11/14 Fi-15 Fi-16/22 Fi-13/27	Fi-15 → Fracção descartada  Restantes fracções sujeitas a análise por ESI-MS/MS

**Tabela A.6:** Registo da coluna cromatográfica Gi

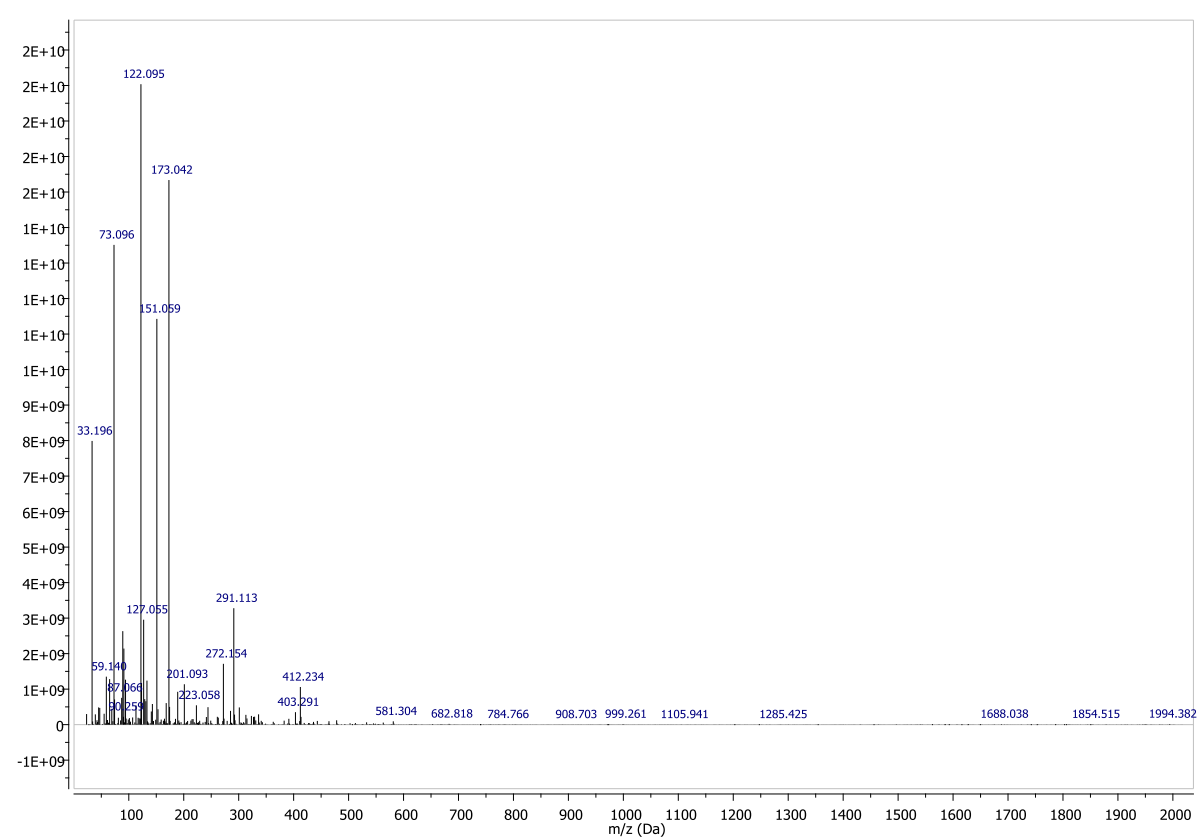
<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>	Coluna Gi	
<b>Material a fraccionar</b>	Amostras A <sub>2/3</sub> , A <sub>7/8</sub> e A <sub>9</sub> (G.t. aq	→ Amostras obtidas por coluna preparativa (A <sub>2/3</sub> , A <sub>7/8</sub> e A <sub>9</sub> )
<b>Quantidade</b>	A <sub>2/3</sub> + A <sub>7/8</sub> + A <sub>9</sub> ) 86,7 mg	
<b>Enchimento</b>	Sephadex LH-20	
<b>Altura</b>	20 cm	Lote 10042455 Pack 239064 GE Healthcare
<b>Diâmetro</b>	2,5 cm	
<b>Cabeça</b>	Não	
<b>Eluição:</b>	Fracções A <sub>2/3</sub> + A <sub>7/8</sub> + A <sub>9</sub>	MeOH → Gi-1 a Gi-6 Acetona/Água (1/1) → Gi-7 a Gi-9 MeOH → Gi-10
<b>Nº total de fracções</b>	10 fracções	
<b>Volume médio</b>	≈ 15 mL	
<b>Programa de eluição</b>	MeOH Acetona/Água (1/1) MeOH	
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC: Gi-1/2 Gi-3/4 Gi-5/6 Gi-7/10	Fracções reunidas sujeitas a análise por ESI-MS/MS para identificação e caracterização de compostos



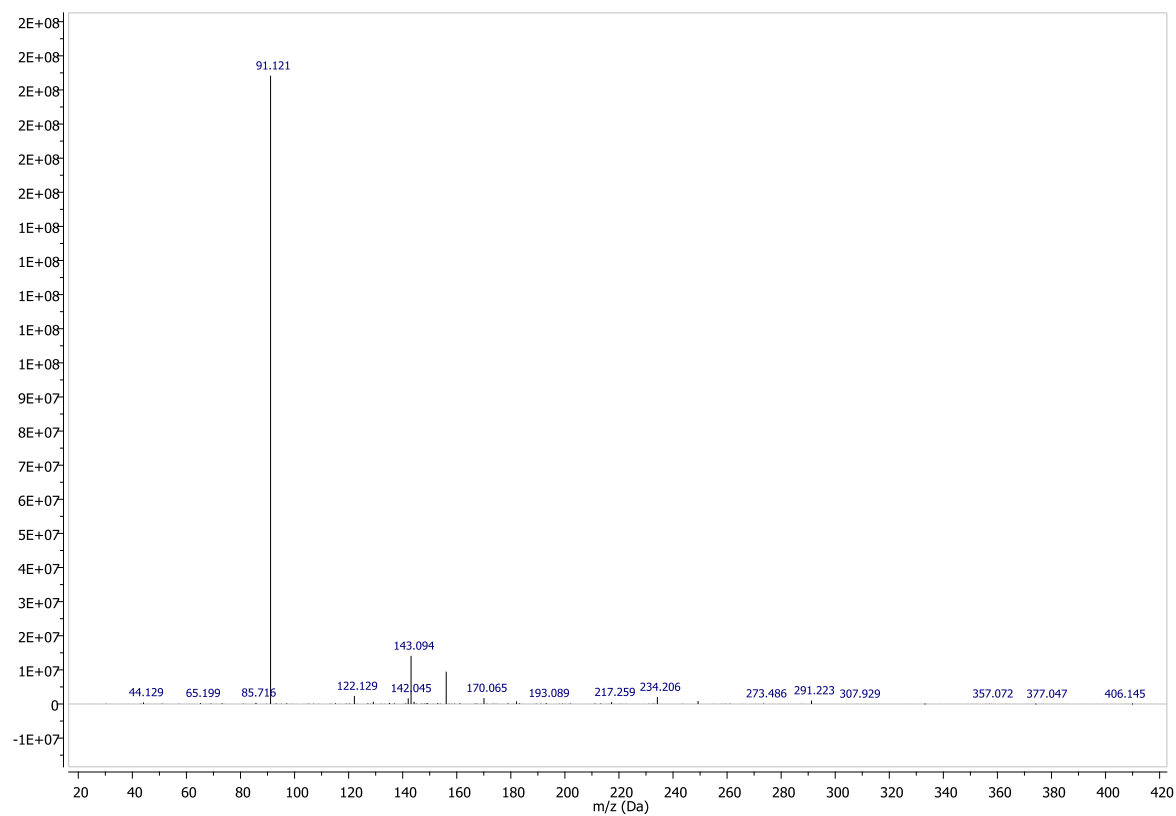
**Tabela A.7:** Registo da coluna cromatográfica Hi

<b><i>Parâmetros</i></b>	<b><i>Registo</i></b>	<b><i>Observações</i></b>
<b>Referência</b>	Coluna Hi	→ Amostra obtida por coluna preparativa (A <sub>16/18</sub> )
<b>Material a fraccionar</b>	Amostra A <sub>16/18</sub> (G.t. aq A <sub>16/18</sub> )	
<b>Quantidade</b>	30,0 mg	
<b>Enchimento</b>	Sephadex LH-20	Lote 10042455 Pack 239064 GE Healthcare
<b>Altura</b>	20 cm	
<b>Diâmetro</b>	2,5 cm	
<b>Cabeça</b>	Não	
<b>Eluição:</b>	Fracção A <sub>16/18</sub>	MeOH → Hi-1 a Hi-5 Acetona/Água (1/1) → Hi-6 a Hi-7 MeOH → Hi-8
<b>Nº total de fracções</b>	8 fracções	
<b>Volume médio</b>	≈ 15 mL	
<b>Programa de eluição</b>	MeOH Acetona/Água (1/1) MeOH	
<b>Fracções reunidas</b>	Após TLC: Hi-1/3 Hi-4/6 Hi-7/8	Fracções descartadas devido à reduzida massa das mesmas

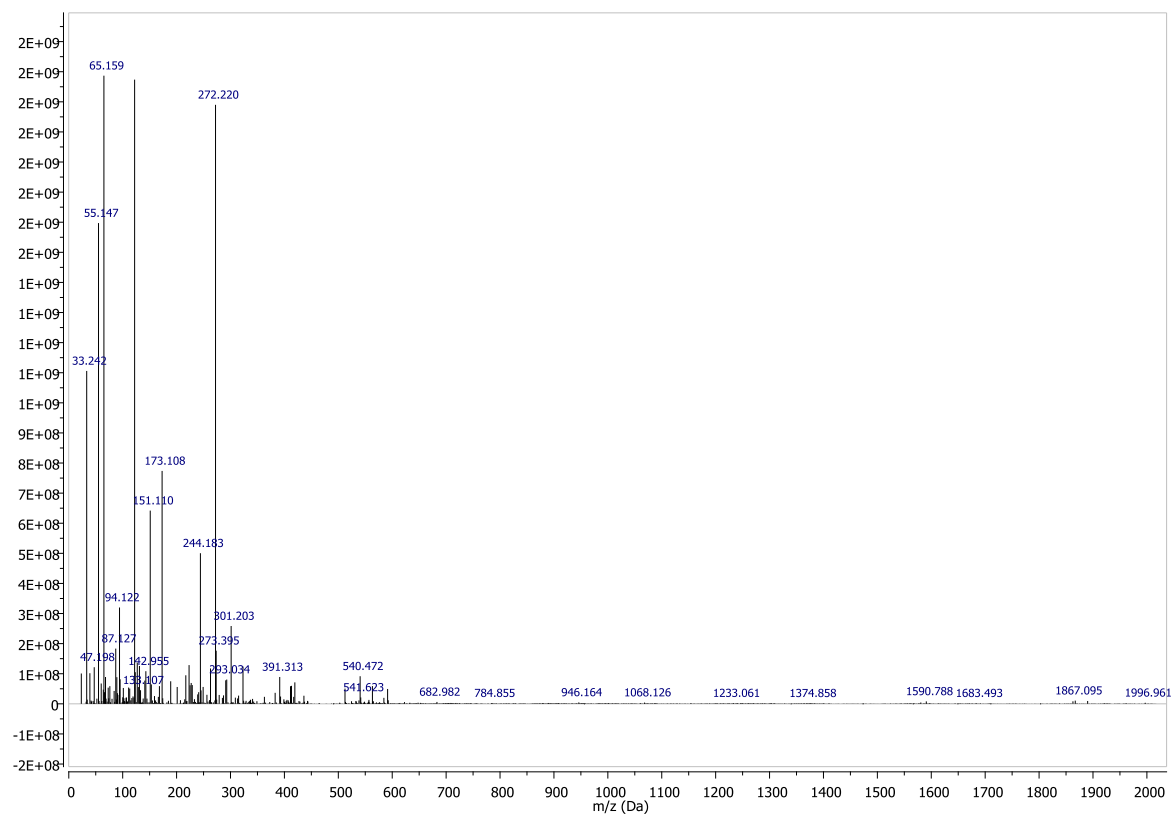
# Anexo B: Espectros de ESI-MS e ESI-MS/MS das amostras analisadas



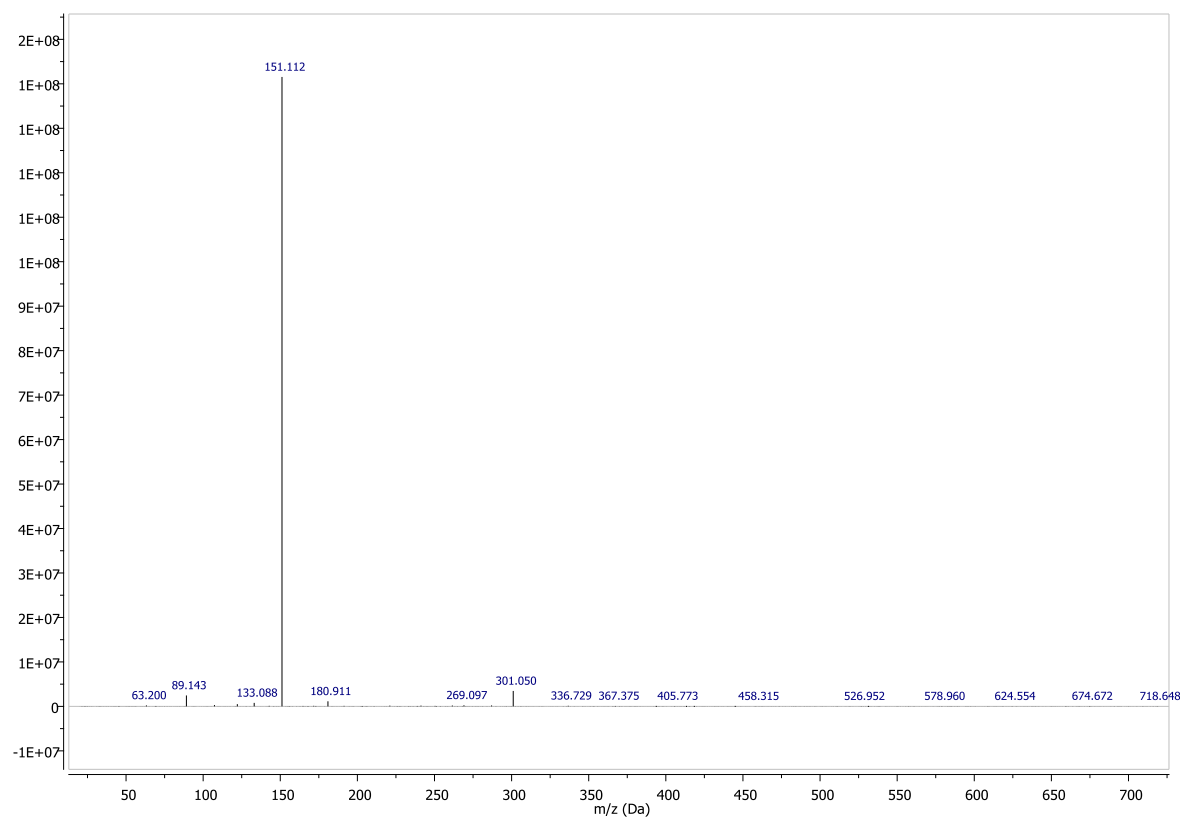
**Anexo B.1:** Espectro de massa da amostra Gi 1/2 no modo positivo (MS SCAN)



**Anexo B.2:** Espectro de massa da amostra Gi 1/2 no modo positivo (DAUGHTER SCAN),  
correspondente ao composto epicatequina

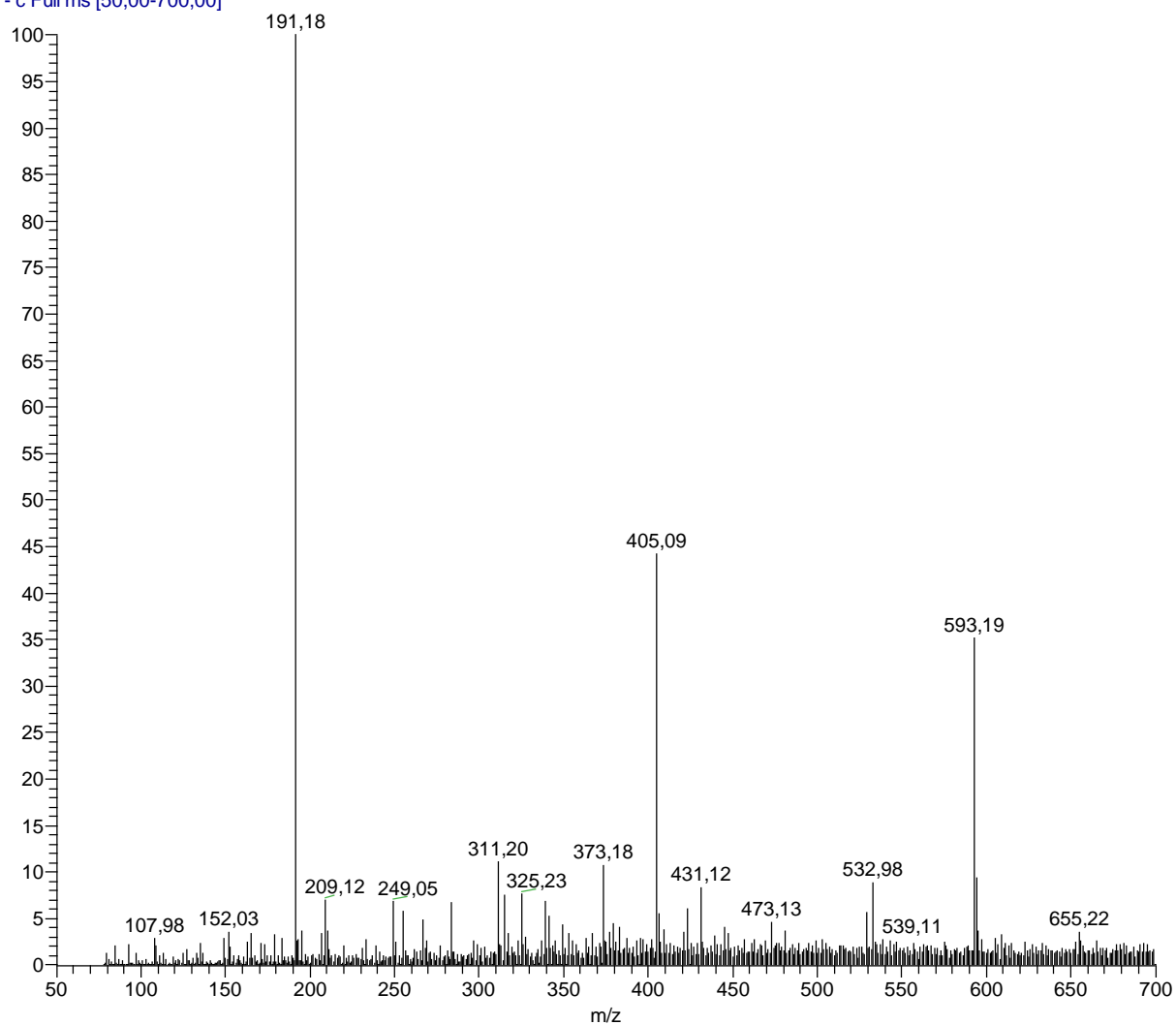


**Anexo B.3:** Espectro de massa da amostra Gi 7/10 no modo positivo (MS SCAN)



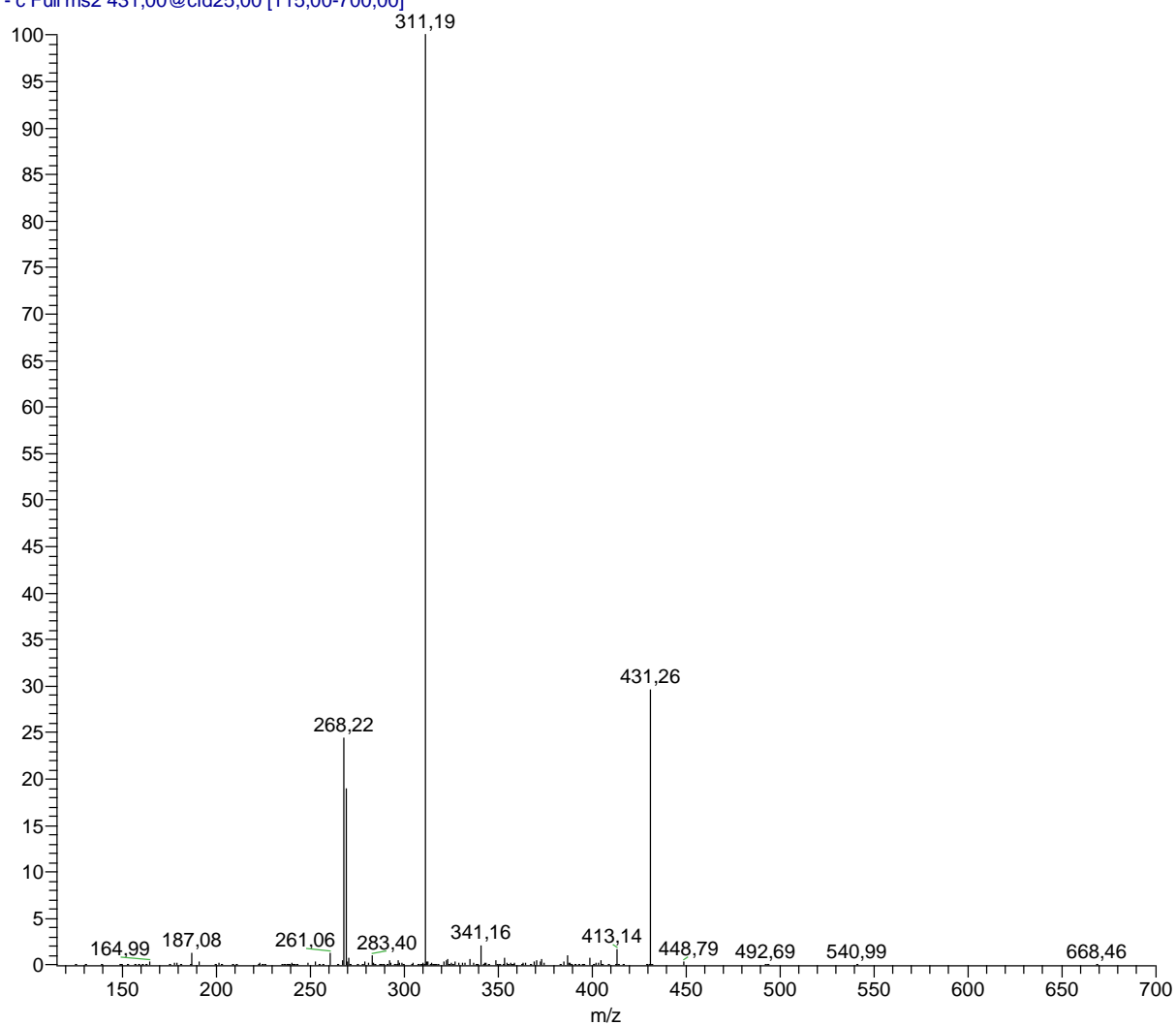
**Anexo B.4:** Espectro de massa da amostra Gi-7/10 no modo positivo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto crisoeiril

gt-ei-1-2.full #1-77 RT: 0,00-1,01 AV: 77 NL: 1,39E6  
T: -c Full ms [50,00-700,00]



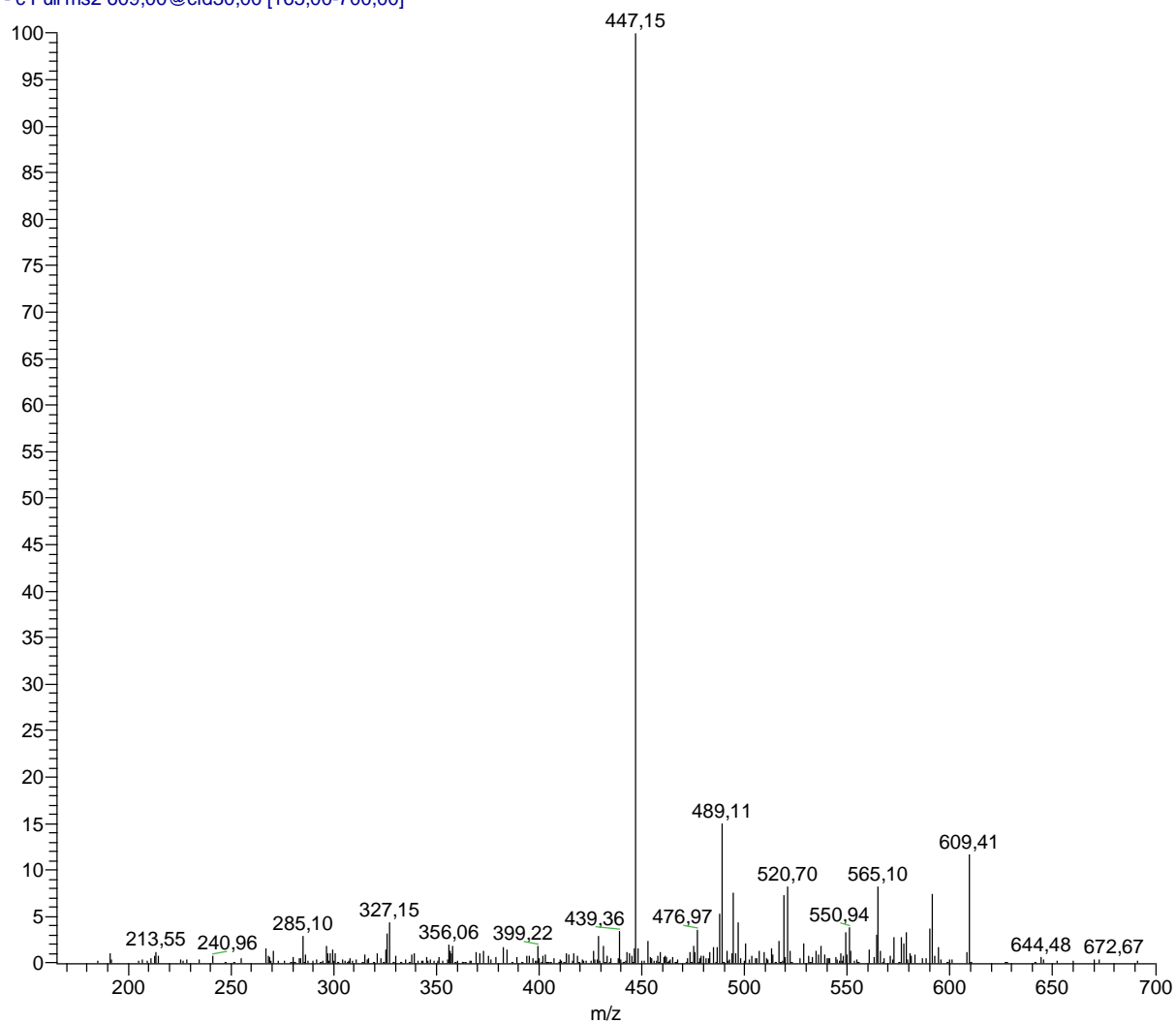
**Anexo B.5:** Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (MS SCAN)

gt-ei-1-2,MS2=431,cle=25 #1-42 RT: 0,02-1,00 AV: 42 NL: 4,08E4  
T: - c Full ms2 431,00@cid25,00 [115,00-700,00]



**Anexo B.6:** Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos vitexina e isovitexina

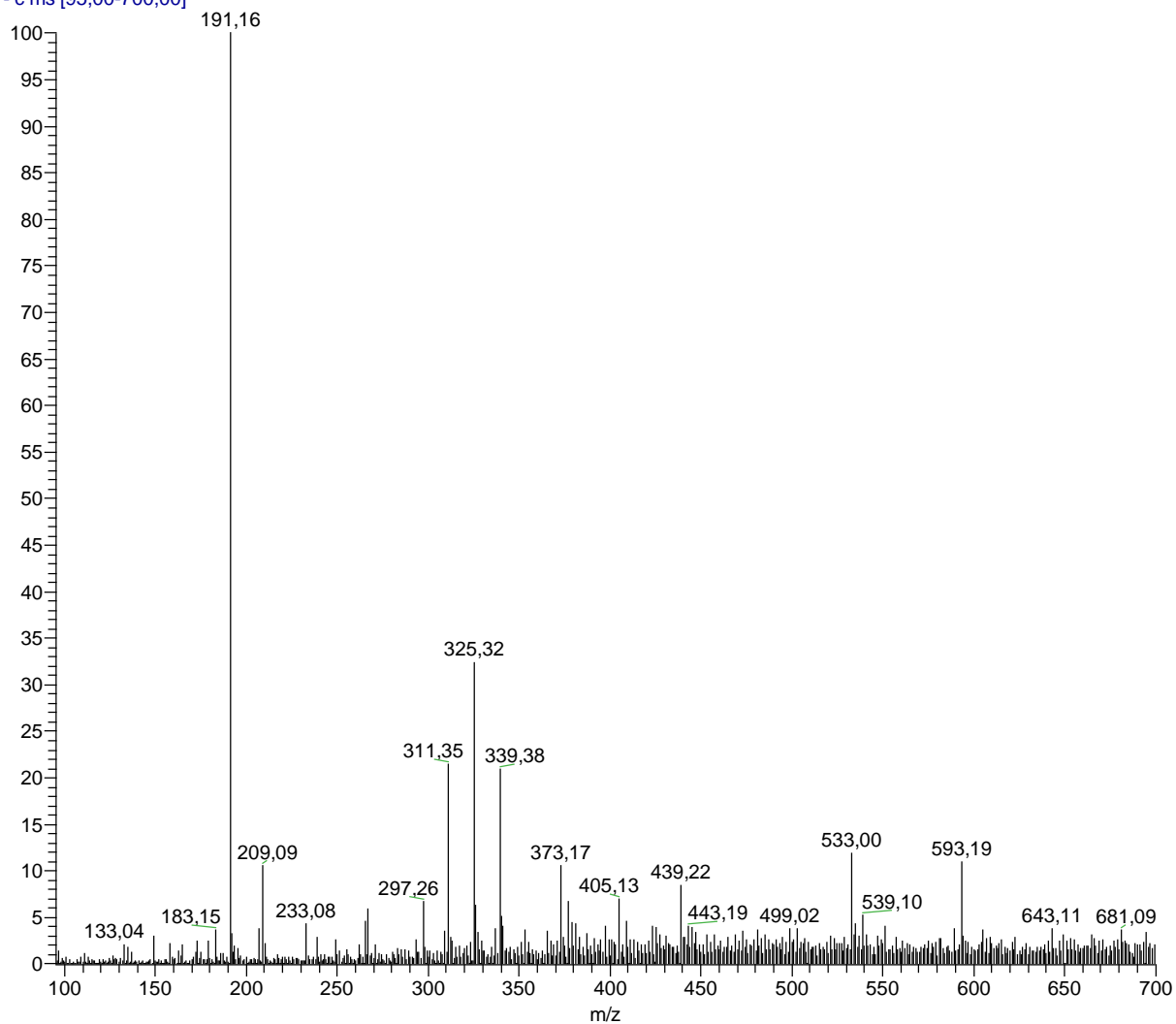
gt-ei-1-2,MS2=609,cle=30 #1-42 RT: 0,02-1,00 AV: 42 NL: 1,17E4  
T: - c Full ms2 609,00@cid30,00 [165,00-700,00]



**Anexo B.7:** Espectro de massa da amostra Ei-1/2 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto luteolina *O*-,*C*-glucosilada

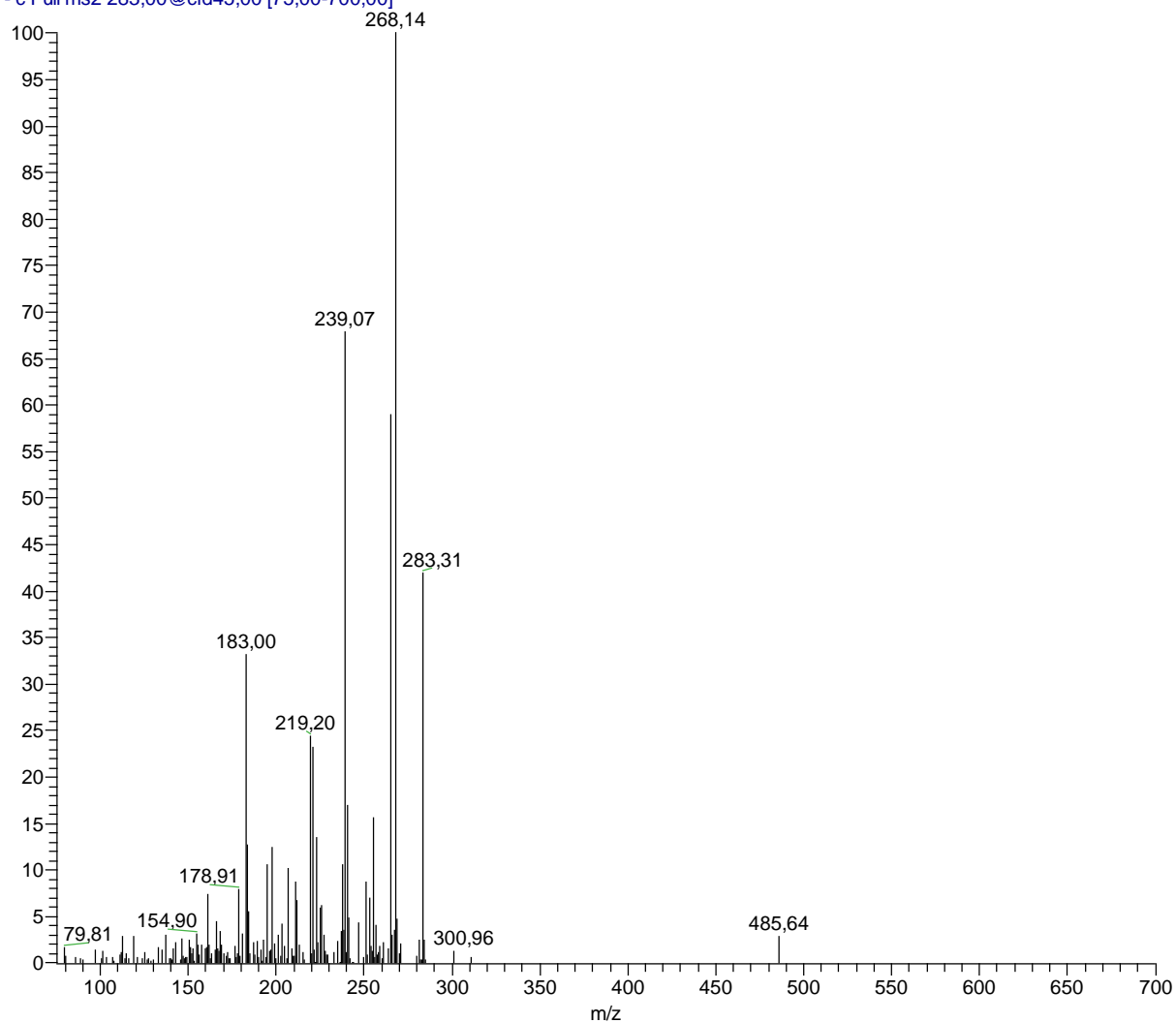


gt-ei-5,full #1-81 RT: 0,01-1,00 AV: 81 NL: 5,57E6  
T: - c ms [95,00-700,00]



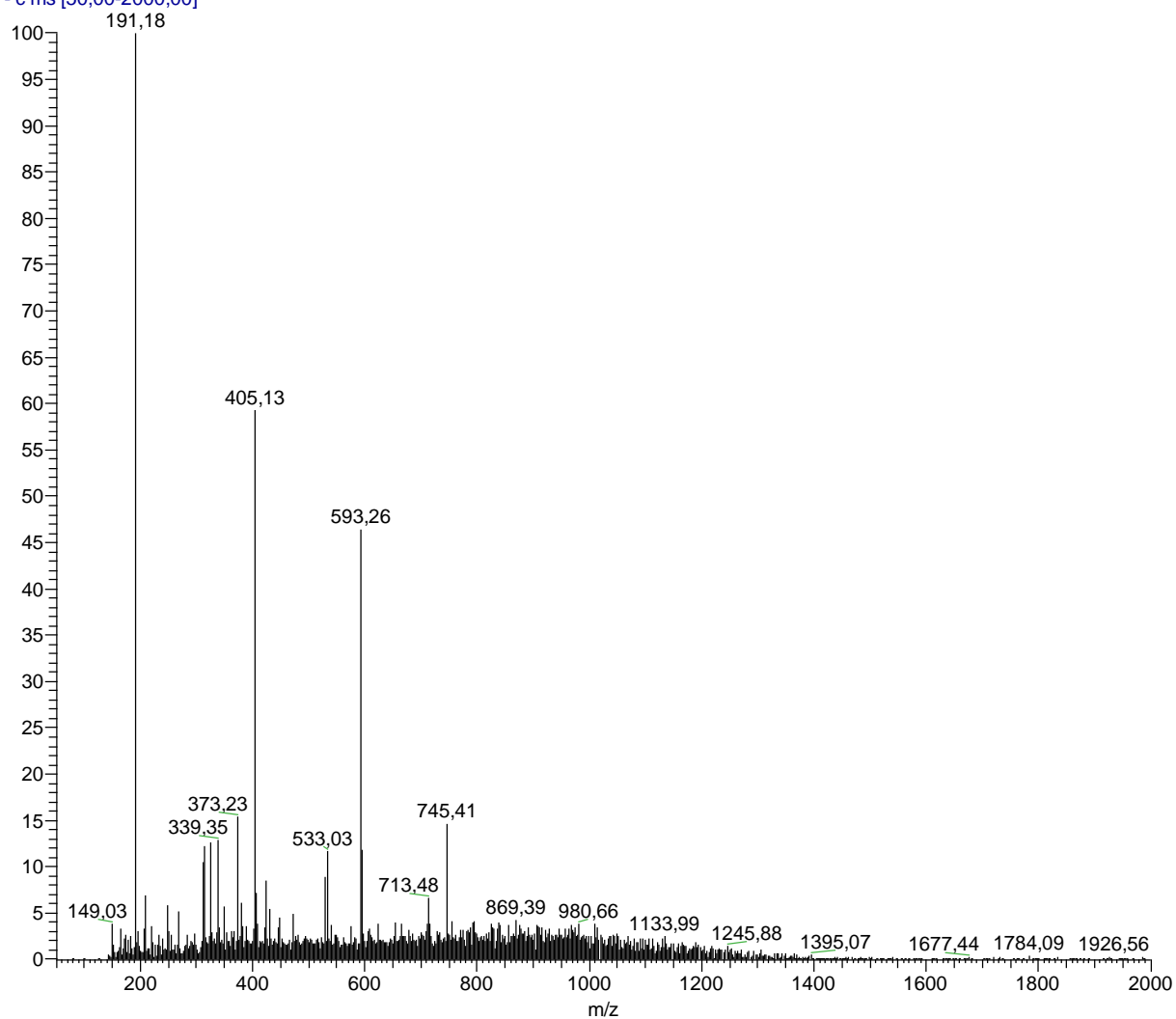
**Anexo B.8:** Espectro de massa da amostra Ei-5 no modo negativo (MS SCAN)

gt-ei-5,MS2=283,CLE=45 #1-42 RT: 0,00-1,00 AV: 42 NL: 5,44E3  
T: - c Full ms2 283,00@cid45,00 [75,00-700,00]



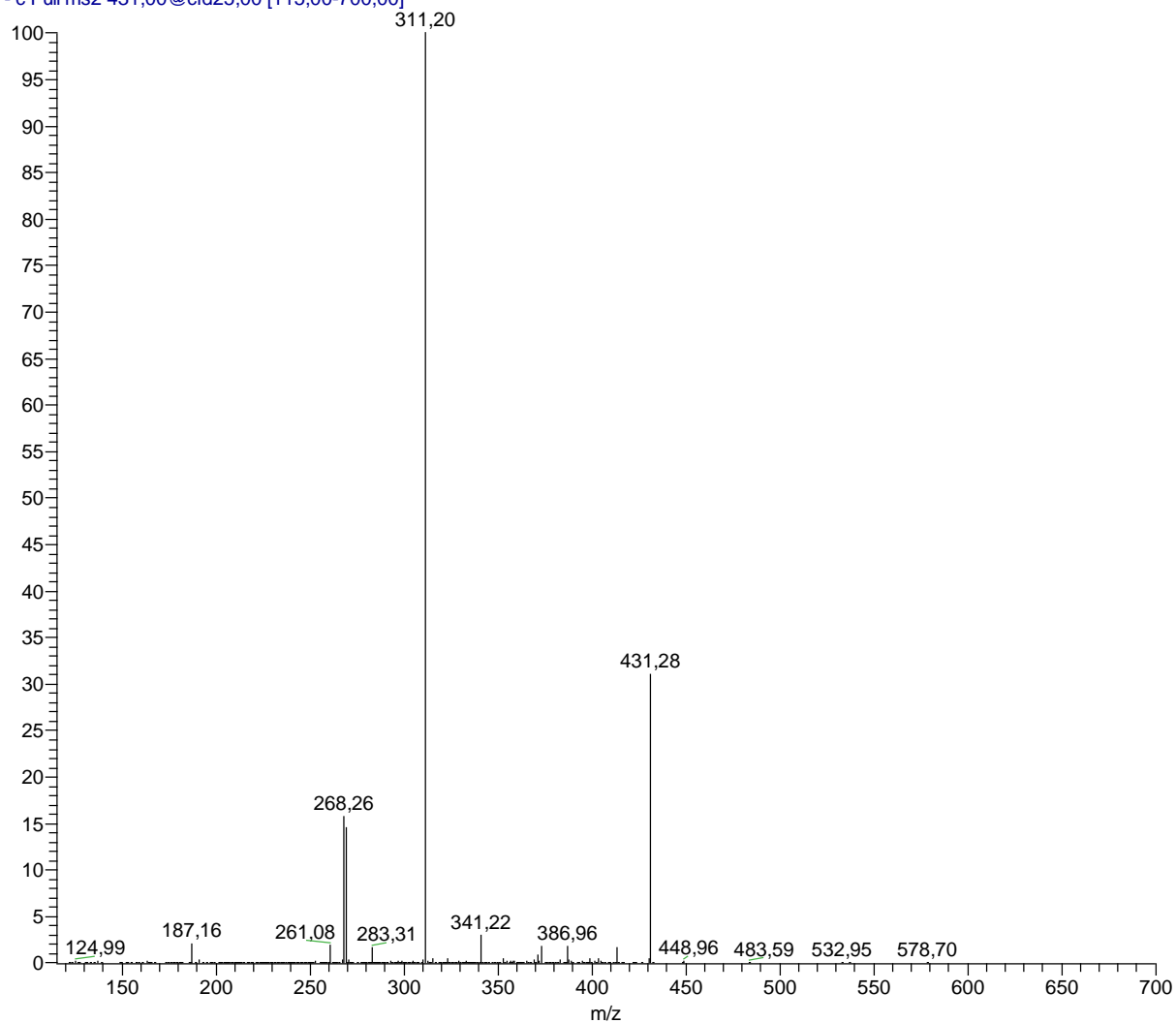
**Anexo B.9:** Espectro de massa da amostra Ei-5 no modo negativo (DAUGHTER SCAN),  
correspondente ao composto biochanina A

gt-ei-6-11,full #1-37 RT: 0,02-1,02 AV: 37 NL: 3,06E6  
T: - c ms [50,00-2000,00]



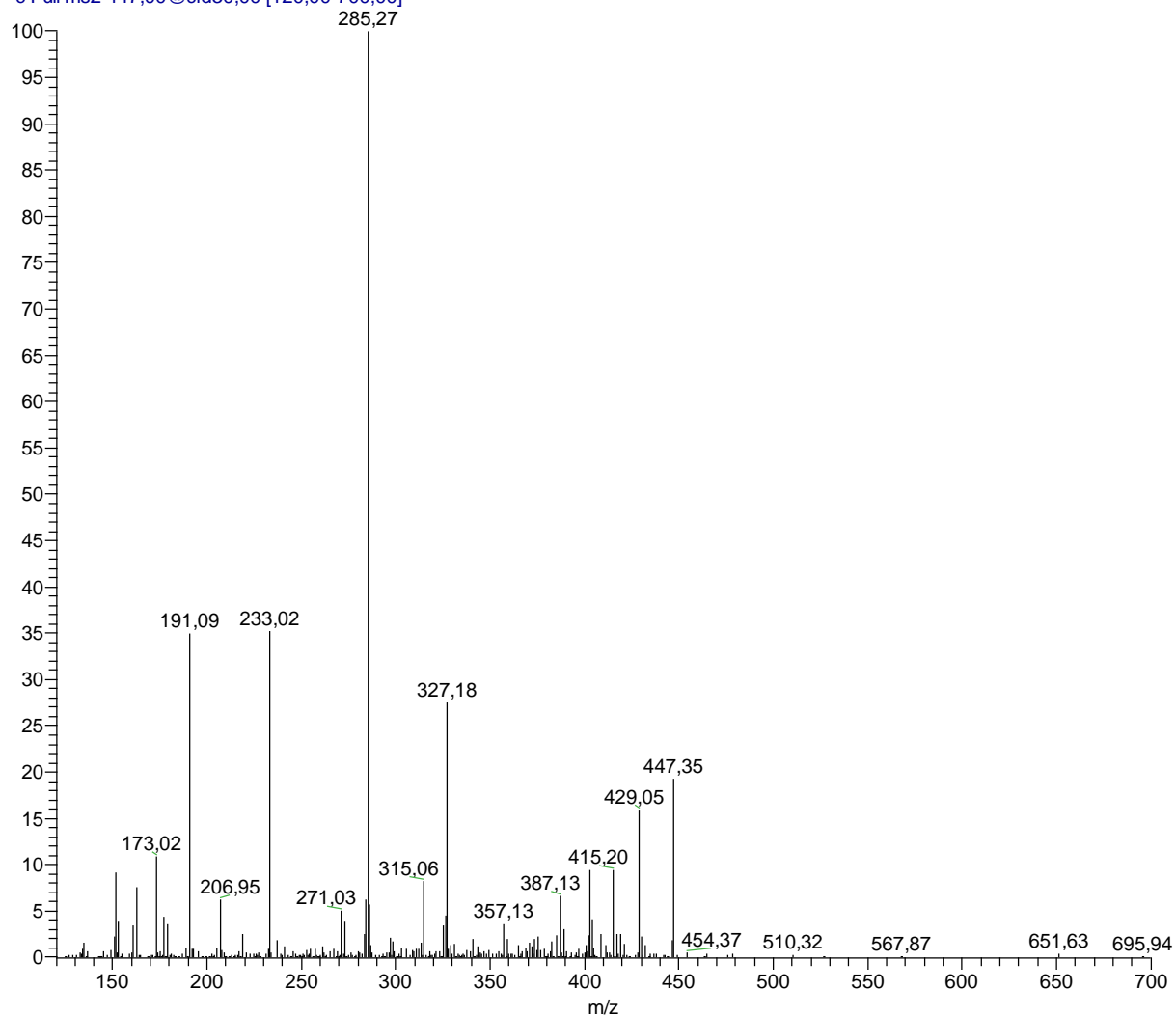
**Anexo B.10:** Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (MS SCAN)

gt-ei-6-11,MS2=431,cle=25 #1-42 RT: 0,00-0,99 AV: 42 NL: 1,84E5  
T: - c Full ms2 431,00@cid25,00 [115,00-700,00]



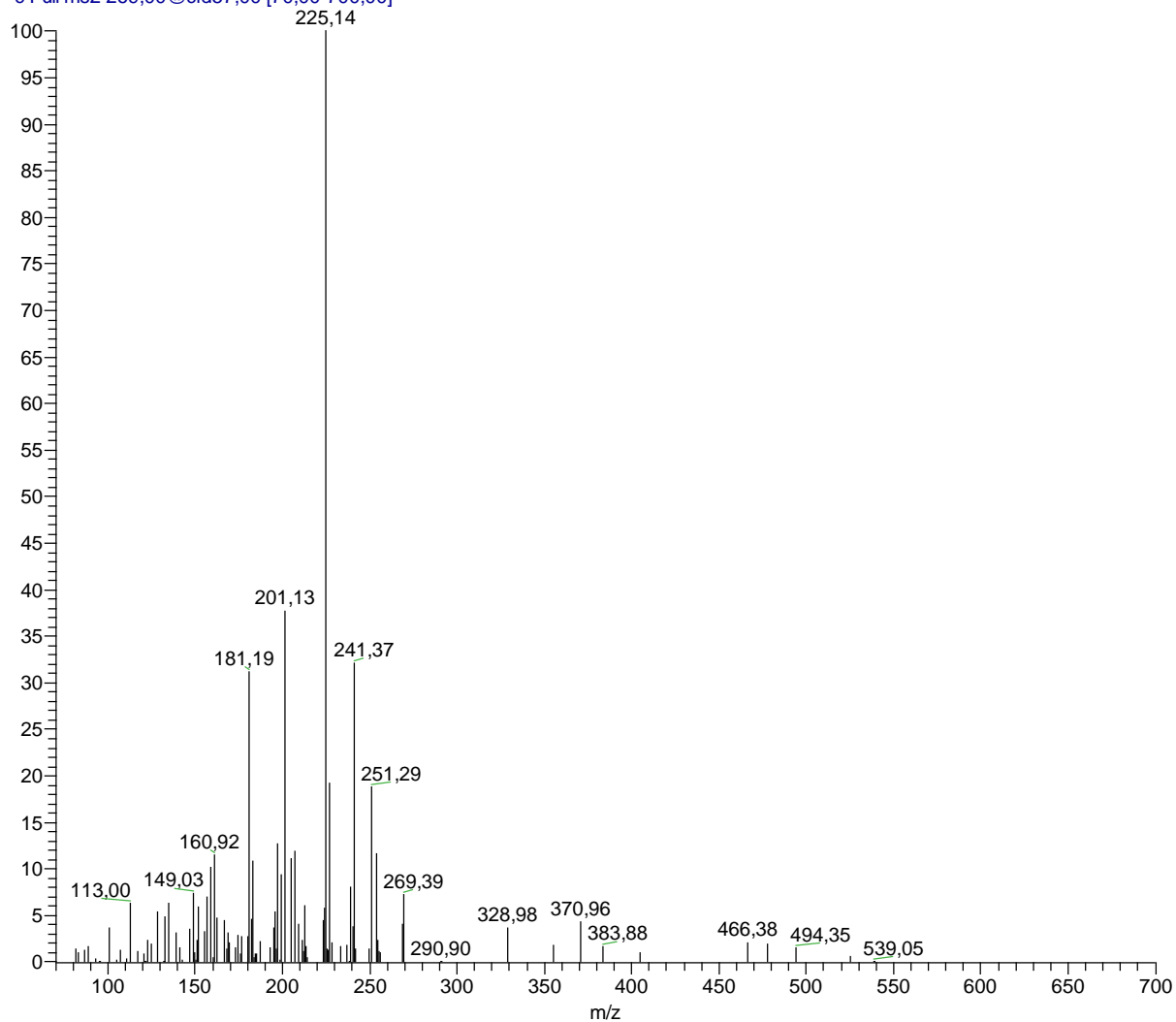
**Anexo B.11:** Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente ao composto 7-*O*-glucósido de genisteína

gt-ei-6-11,MS2=447,cle=30 #1-42 RT: 0,00-0,99 AV: 42 NL: 2,76E4  
T: - c Full ms2 447,00@cid30,00 [120,00-700,00]



**Anexo B.12:** Espectro de massa da amostra Ei-6/11 no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos 7-*O*-glucósido de orobol, 8-glucosilorobol e 7-*O*-glucósido de luteolina

10-13-2ms2=269 #1-42 RT: 0,00-1,00 AV: 42 NL: 2,11E3  
T: - c Full ms2 269,00@cid57,00 [70,00-700,00]



**Anexo B.13:** Espectro de massa da amostra A<sub>10/13</sub> no modo negativo (DAUGHTER SCAN), correspondente aos compostos apigenina e genisteína